

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



DEPOSIÇÃO DE COLAGÉNIO NA PLACENTA EQUINA: POSSÍVEL RELAÇÃO COM A
IDADE DA ÉGUA E PESO DO POLDRO

ANA CATARINA HORTA SANTOS NETO DA SILVA

ORIENTADORA:
Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



DEPOSIÇÃO DE COLAGÉNIO NA PLACENTA EQUINA: POSSÍVEL RELAÇÃO COM A
IDADE DA ÉGUA E PESO DO POLDRO

ANA CATARINA HORTA SANTOS NETO DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

VOGAIS:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor Mário António Pereira da Silva Soares
de Pinho

ORIENTADORA:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2020

Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Ana Catarina Horta Santos Neto da Silva

Título da Tese ou Dissertação: Deposição de colagénio na placenta equina: possível relação com a idade da égua e peso do poldro

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2020

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☒ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 17 de Dezembro de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:

Ana Catarina Neto da Silva

Agradecimentos

À minha querida Orientadora, Professora Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias, agradeço a constante disponibilidade, a dedicação, o carinho e a amizade, sem os quais este projeto não seria alcançável.

Ao incansável Professor Doutor José Ferreira da Silva, que se disponibilizou imediatamente para me ajudar e cuja ajuda foi valiosa e determinante neste projeto.

À Professora Doutora Maria Rosa Rebordão, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra que, mesmo à distância, esteve presente e sempre disponível.

À Dr^a. Ana Costa da Embriovet, pela recolha das amostras de placentas e dos dados relativos às éguas e aos poldros da Coudelaria de Haras de La Gesse em Toulouse, França.

À Dr^a. Carina Fernandes, pela bonita amizade, pela ajuda no laboratório e, acima de tudo, pelas palavras que me confortaram e me mostraram novos caminhos.

À Dr^a. Joana Alpoim, pela boa disposição, companhia e pela ajuda em qualquer momento, dentro e fora do laboratório.

Ao Técnico Luís Marques e ao Professor Telmo Nunes, do Laboratório de Microscopia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade e preciosa ajuda.

Aos meus queridos amigos, Marta, Bia, Rita, Sofia, Laura, Bernardo, André e Leni, pelas gargalhadas partilhadas, pelas conversas sem fim, pelo desespero e sofrimento das épocas de exames e por terem percorrido este maravilhoso percurso comigo.

Aos melhores amigos, Inês, Maria, Guida e Gonçalo, que me acompanham desde que me lembro e que estão sempre por perto.

Ao meu melhor amigo Miguel, pelo amor e carinho, pela cumplicidade, por me apoiar incondicionalmente, por estar sempre presente e por me dar a mão e ajudar a levantar nos momentos difíceis.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, a quem tudo tenho a agradecer. Agradeço o amor incondicional, a presença, a compreensão e a paciência. Agradeço por me escutarem e por me aconselharem, por acreditarem sempre em mim, por me apoiarem em qualquer das minhas decisões e por me darem a possibilidade de escolher e percorrer o meu caminho. Sem vocês nada seria possível. Por isso, a vós dedico esta tese. Um eterno obrigado.

“Põe quanto és no mínimo que fazes”,

Fernando Pessoa

Resumo

Deposição de colagénio na placenta equina: possível relação com a idade da égua e peso do poldro

Em égua idosas, o aumento das fibras de colagénio no endométrio predispõe à sub-fertilidade e infertilidade. Visto que, quando o colagénio está presente no endométrio equino também está no oviduto, propôs-se a hipótese de também poder existir na placenta e, desta forma, contribuir para uma diminuição do peso do poldro à nascença. Como tal, o objetivo principal deste estudo foi avaliar (quantitativamente e qualitativamente) a presença de fibras de colagénio na placenta equina e a sua relação com o aumento da idade da égua e com o peso do poldro. A placenta foi pesada imediatamente após a sua expulsão e o poldro foi pesado às 24h pós-nascimento. Foram recolhidas amostras do corno grávido, do corno não-grávido e do corpo da placenta de éguas mais novas com idades inferiores a 10 anos (Novas; n=7), e de éguas mais velhas, com idades entre os 10 e os 15 anos (Idosas; n=9), de diferentes raças. Os tecidos foram colocados em formaldeído a 4 % (para estudos histológicos) e em RNA Later (para determinação de transcrição e da proteína). A presença de colagénio na placenta foi avaliada através da quantificação de transcritos de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1* por PCR em tempo real, e de proteína total, indiretamente, através da concentração de hidroxiprolina. Além disso, foi realizada uma avaliação qualitativa histológica do colagénio dos tipos I e III em cortes de placenta corados com Picrosirius Red e observados ao microscópio ótico sob um feixe de luz polarizada. Foi também realizada a medição da espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido da placenta equina. Os dados foram analisados por ANOVA a um fator seguido dos respetivos testes *post-hoc* ou pelo teste de correlação de Pearson (GraphPad Prism e Statistica 7). Houve um aumento dos níveis de mRNA de *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1* e de hidroxiprolina no corno grávido de éguas idosas (≥ 10 anos; $p < 0,05$). Além disso, a espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido da placenta equina foi maior em éguas idosas quando comparada com éguas novas ($p < 0,05$). Foi observada uma correlação positiva entre o peso do poldro e o peso da placenta ($R = 0,7284$; $p = 0,001$), assim como, entre o peso do poldro e a idade da égua ($R = 0,6596$; $p = 0,005$). Apesar de não ter sido encontrada uma correlação entre o colagénio total presente na placenta e a idade da égua ou o peso do poldro, a fibrose, que é caracterizada pelo aumento da deposição de fibras de colagénio, foi maior no corno grávido de placentas de éguas idosas, o que tem sido considerado um sinal de insuficiência placentária noutras espécies, com repercussões negativas no peso do recém-nascido.

Palavras-chave: colagénio, fibrose, placenta, idade, égua

Abstract

Collagen deposition in equine placenta: possible connection with mare's age and foal's weight

In older mares, increasing collagen fibers in the endometrium predisposes to sub-fertility and infertility. Since when collagen is present in the mare endometrium it also is in the oviduct, we hypothesized that it could also exist in the placenta, and therefore contribute for a lower weight of the newborn foal. Thus, the main objective of this study was to evaluate (quantitatively and qualitatively) the presence of collagen fibres in mare's placenta with ageing and its putative relationship with neonate birth weight. The placenta was weighed immediately after its expulsion and the foal was weighed 24h *post-partum*. Tissue samples were collected from the gravid horn, non-gravid horn and body of the placenta from younger mares, under 10 years of age (Young; n=7), and from older mares, between 10 and 15 years old (Aged; n=9), of different breeds. They were placed in 4% formaldehyde (for histological studies) and in RNA Later (for determination of transcripts and protein). The presence of collagen in the placenta was determined by the quantification of transcripts of *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* and *COL5A1* by real-time PCR, and of total collagen protein, indirectly assessed based on hydroxyproline concentration. In addition, a qualitative histological evaluation of collagen type I and III was performed in placenta sections stained with Picrosirius Red and observed under light microscope, under a polarized light beam. The thickness of the chorionic plate connective tissue of the equine placenta pregnant horn was also evaluated. Data were analysed by one-way ANOVA followed by the respective *post-hoc* tests or by Pearson's correlation test (GraphPad Prism and Statistica 7). There was an increase in mRNA levels of *COL1A1*, *COL3A1* and *COL5A1* and of hydroxyproline in the pregnant horn of old mares (≥ 10 years; $p < 0.05$). In addition, the connective tissue thickness of the chorionic plate in the equine placenta pregnant horn was bigger in old mares when compared to young mares ($p < 0.05$). A positive correlation was observed between foal's weight and placenta's weight ($R = 0.7284$; $p = 0.001$), as well as, between foal's weight and the age of the mare ($R = 0.6596$; $p = 0.005$). Although no correlation was found between the total collagen present in the placenta and the age of the mare, nor the weight of the foal, fibrosis, which is characterized by increased collagen fibre deposition, was higher in the pregnant horn of old mares' placentas. This has been considered as a sign of placental insufficiency in other species, with a putative negative outcome in the weight of the neonate.

Key-words: collagen, fibrosis, placenta, age, mare

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
Parte I- Enquadramento do estudo	1
1. Descrição das atividades desenvolvidas em estágio.....	1
1.1 Estágio curricular.....	1
1.2 Estágio extra-curricular.....	2
2. Introdução.....	3
3. Objetivos propostos	4
Parte II- Revisão bibliográfica	5
1. Anatomia da placenta	5
2. Histologia da placenta.....	5
3. Breve fisiologia da gestação	6
4. Avaliação da placenta <i>post-partum</i>	7
5. Patogénese da fibrose	9
5.1. Imunidade inata não-específica	9
5.2 Imunidade adquirida específica	11
5.3 Fibroblastos e miofibroblastos	11
6. Fibrose no trato genital feminino	12
6.1 Fibrose no endométrio.....	12
6.2 Fibrose no oviduto	14
6.3 Fibrose na placenta	14
7. Sub-fertilidade/ infertilidade em éguas idosas	15
7.1 Anomalias do oviduto.....	16
7.2 Angioesclerose da vasculatura uterina.....	16

7.3	Endometrose	17
7.3.1	Avaliação de biópsia uterina e classificação do tipo de endométrio	18
7.3.2	Placentação	19
8.	Patologia placentária e alteração dos níveis hormonais	20
Parte III- Trabalho experimental		22
1.	Materiais e métodos	22
1.1.	Identificação de éguas	22
1.2.	Recolha de amostras	23
1.3.	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (qRT-PCR)	23
1.4.	Determinação da concentração de hidroxiprolina	25
1.5.	Avaliação histológica qualitativa de COL1 e COL3 na placenta da égua	26
1.6	Medição da espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido da placenta equina	26
1.7	Análise estatística	27
2.	Resultados	28
2.1	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (qRT-PCR)	28
2.1.1	Níveis de transcritos de mRNA de COL1A1, COL1A2, COL3A1 e COL5A1	28
2.2	Determinação da concentração de hidroxiprolina	30
2.3	Avaliação histológica qualitativa de COL1 e COL3 na placenta da égua	31
a)	Éguas novas	33
b)	Éguas idosas	34
2.4	Medição da espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido da placenta equina	35
2.5	Correlações entre variáveis	36
Parte IV- Discussão		38
Parte V- Conclusões		42
Parte VI- Referências bibliográficas		43
Anexo 1		52

Lista de figuras

Figura 1. Corte histológico de corioalantóide equina corado por Picrosirius Red.....	6
Figura 2. Corioalantóide equina disposta em F.	8
Figura 3. Esquema representativo da placenta de égua disposta em F.....	23
Figura 4. Corte histológico do corno grávido da placenta equina corado com Picrosirius Red.	26
Figura 5. Níveis de transcrição de <i>COL1A1</i> no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.	29
Figura 6. Níveis de transcrição de <i>COL3A1</i> no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.	29
Figura 7. Níveis de transcrição de <i>COL5A1</i> no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.	30
Figura 8. Níveis de hidroxiprolina no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.	30
Figura 9. Corte histológico do corno grávido da placenta equina corado com Picrosirius Red.	31
Figura 10. Corte histológico do corno grávido da placenta equina corado com Picrosirius Red.	32
Figura 11. Corte histológico do corpo da placenta equina corado com Picrosirius Red.	32
Figura 12. Corte histológico do corpo da placenta equina corado com Picrosirius Red.	33
Figura 13. Espessura do tecido conjuntivo da placa corial do corno grávido de éguas novas e de éguas idosas.....	35
Figura 14. Correlação de Pearson e regressão linear entre o peso da placenta (Kg) e o peso do poldro às 24h (Kg) ($p=0,001$).	36
Figura 15. Correlação de Pearson e regressão linear entre a idade da égua (anos) e o peso do poldro às 24h (Kg) ($p=0,005$).	36
Figura 16. Correlação de Pearson e regressão linear entre a idade da égua (anos) e o peso da placenta (Kg) ($p=0,005$).....	36
Figura 17. Correlação de Pearson e regressão linear entre a idade da égua (anos) e a duração da gestação (dias) ($p=0,005$).....	37
Figura 18. Formulário de recolha de amostras de placenta equina.	53

Lista de tabelas

Tabela 1. Éguas utilizadas para a recolha de placentas.	22
Tabela 2. Distribuição de éguas em “éguas novas” e “éguas idosas” consoante a idade...	22
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> utilizada na análise qRT-PCR.....	24

Tabela 4. Média (\pm erro padrão) da idade, número de partos, dias de gestação, peso da placenta (Kg) e peso do poldro (Kg) às 24h, consoante o grupo das éguas.....28

Lista de abreviaturas

5 α -DHP – *5 α -pregane,3,20,-dion*

α -SMA – *α -Smooth Muscle Actin*

β 2M – *Beta-2-Microglobulin*

a.C. – antes de Cristo

CCL2 – *C-C Motif Chemokine Ligand 2*

cDNA – *complementar Deoxyribonucleic Acid*

CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal

COL1A1 – Colagénio de tipo I α 1

COL1A2 – Colagénio de tipo I α 2

COL3A1 – Colagénio de tipo III α 1

COL5A1 – Colagénio de tipo V α 1

CT – número de ciclo fracionário do limiar

CTGF – *Connective Tissue Growth Factor*

DMAB – (Dimetilamino)benzaldeído

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

E – Nível de eficiência do *primer*

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

IFN- γ – Interferão γ

IL – Interleucina

KWPN – *Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland*

LSD – *Least Significant Difference*

MBP – *Major Basic Protein*

MEC – Matriz Extracelular

MMPs – *Matrix Metalloproteinases*

mRNA – *messenger Ribonucleic Acid*

NETs – *Neutrophil Extracellular Traps*

P₄ – Progesterona

P₅ – Pregnenolona

PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

PSL – Puro Sangue Lusitano

PSR – Picrosirius Red

qRT-PCR - *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

R – Coeficiente de correlação de Pearson

RCIU – Restrição de Crescimento Intra-Uterino

RNA – *Ribonucleic Acid*

RPL32 – *Ribossomal Protein L32*

SCUE – Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos

SDHA – *Succinate Dehydrogenase Complex A, subunit A, Flavoprotein variant*

TGF-β – *Transforming Growth Factor type β*

Th-1 – Linfócitos T-*helper* tipo 1

Th-2 – Linfócitos T-*helper* tipo 2

TIMPs – *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor α*

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

Parte I- Enquadramento do estudo

1. Descrição das atividades desenvolvidas em estágio

1.1 Estágio curricular

O meu estágio curricular foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Função, no Laboratório do Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA), no Laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, assim como, no Laboratório de Microscopia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob a orientação da Professora Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias. Este estágio decorreu entre 2 de Setembro e 31 de Dezembro de 2019, perfazendo um total de quatro meses e completando um total de 640 horas. Durante este período alternei atividades entre os vários laboratórios, consoante a necessidade exigida pelo trabalho de investigação.

Este trabalho insere-se no projeto de investigação “*F-04 – CIISA MSC Internal Project*” do CIISA e tem como principal objetivo quantificar as fibras de colagénio na placenta equina e avaliar a sua possível relação com a idade da égua e com o peso do poldro à nascença.

Durante o período que estive no Laboratório de Fisiologia e no Laboratório do CIISA tive a oportunidade de desenvolver várias atividades laboratoriais no âmbito do meu projeto, com a ajuda e supervisão das minhas colegas, Dr^a Carina Fernandes e Dr^a Joana Alpoim. Desenvolvi e aperfeiçoei técnicas laboratoriais, nomeadamente, pesagem, maceração, preparação de reagentes, separação de misturas, pipetagem, centrifugação, microscopia ótica, entre outras. Durante este período, tive também a oportunidade de desenvolver técnicas de biologia molecular, tais como, extração de RNA, síntese de cDNA, quantificação com qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e medição de proteína hidroxiprolina através de imuno-ensaio enzimático. Os procedimentos encontram-se detalhadamente descritos à frente, no capítulo “Materiais e Métodos”, replicando as tarefas que desenvolvi nos laboratórios.

No decorrer do período que passei no Laboratório de Microscopia, tive o auxílio do Técnico Luís Marques e do Professor Telmo Nunes, durante a utilização do microscópio ótico acoplado a uma câmara, que permitia a observação de lâminas coradas com Picrosirius Red num computador, possibilitando assim a obtenção de fotografias digitais das mesmas. O Técnico Luís Marques supervisionou estas atividades, orientando-me segundo os princípios da fotografia e elucidando-me acerca de variáveis como a cor, saturação e contraste de uma imagem. Estas variáveis são essenciais para a aquisição de fotografias de qualidade, garantindo a credibilidade das deduções académicas obtidas a partir das mesmas.

Durante o período de estágio curricular também tive a oportunidade de passar algumas horas no Laboratório de Histologia e Embriologia, com a orientação do Professor Doutor José Ferreira da Silva. No laboratório, observámos lâminas coradas com hematoxilina-eosina ao microscópio ótico, sendo que o Professor me ajudou a interpretar a estrutura e organização histológica das placentas equinas. Além disso, também tive a sua ajuda para avaliar e classificar as fotografias obtidas no Laboratório de Microscopia, segundo a quantidade e o tipo de colagénio presentes na amostra. Tive o seu apoio ao longo de todo o período de estágio e, posteriormente, durante a elaboração da Dissertação de Mestrado.

1.2 Estágio extra-curricular

Para além do estágio curricular, tive oportunidade também de realizar um estágio extra-curricular no Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos (SCUE) na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob a orientação do Professor Doutor Luís Lamas, da Dr^a Mariana Magalhães e da Dr^a Teresa Rosa, desde 2 de Janeiro a 28 de Fevereiro de 2020, completando um total de dois meses.

O SCUE é um serviço hospitalar de referência com uma casuística bastante diversificada, mas que recebe, essencialmente, emergências gastrointestinais e ortopédicas. Tive a oportunidade de assistir a várias cirurgias urgentes ou eletivas (tais como, urgências gastrointestinais e ortopédicas, artroscopias, castrações, estética, dentisteria, entre outras) e de participar na preparação pré-cirúrgica e no recobro pós-cirúrgico do animal. Durante este período pude também assistir e seguir diversas consultas e casos de referência. Além disso, participei na rotina diária do hospital, fazendo turnos de dia e de noite e realizando diversas tarefas, incluindo apresentação e discussão de casos clínicos, monitorização de cavalos na Unidade de Cuidados Intensivos (UCI), administração de terapêutica, aplicação de pensos ou ligaduras e participação na recolha de diagnósticos imagiológicos através da realização de ecografia e raio-x. Tive ainda oportunidade de participar em casos de neonatologia, oftalmologia e dermatologia.

Devido à situação pandémica que teve início a Março de 2020, o estágio extra-curricular que seria realizado em Reprodução Equina, tendo lugar em França, na Coudelaria Haras de La Gesse (Toulouse), foi cancelado. Durante o período que decorreu entre 31 de Março e 31 de Maio de 2020 (2 meses), seriam recolhidas biópsias de endométrio das éguas das quais recolhemos as placentas, de forma a relacionar, eventualmente, o grau de fibrose do endométrio com o grau de fibrose presente na placenta.

2. Introdução

A égua é um mamífero poliéstrico sazonal com ciclos éstricos regulares que ocorrem em dias de maior luminosidade (dias longos). Durante o período reprodutivo, a égua apresenta intervalos interovulatórios de 21 dias e, durante um intervalo interovulatório, ocorrem ondas foliculares com a seleção de um único folículo ovulatório (Carnevale 2008). Na maioria das éguas, após a época de transição, os ovários tornam-se inativos durante o Inverno (anestro sazonal) (Ferreira-Dias et al. 2005). A maior parte das éguas exibe ciclos éstricos ao longo da vida (>20 anos). No entanto, a sua capacidade de produzir poldros viáveis e saudáveis diminui por volta dos 15 anos (Ricketts and Alonso 1991; Morris and Allen 2002).

A placenta equina é um órgão extremamente complexo que atua em sincronia com o desenvolvimento e necessidades fetais, assim como, com a égua e a sua capacidade para manter a gestação (Pozor 2016). É um órgão que transporta nutrientes, gases respiratórios e resíduos entre o sistema materno e o sistema fetal. A importância da placenta no crescimento fetal é reconhecida desde os tempos antigos. Aliás, no seu tratado *“On the Generation of Animals”* (340 a.C.), Aristóteles declarou (citado por Reynolds et al. 2006):

“The [umbilical] vessels join on the uterus like the roots of plants and through them the embryo receives its nourishment.”

Como tal, o fluxo sanguíneo da placenta e o desenvolvimento vascular são componentes essenciais da função placentária normal e são críticos para o crescimento e desenvolvimento fetal. Por sua vez, o crescimento e desenvolvimento normal fetal são essenciais para assegurar a ótima saúde dos descendentes ao longo das suas vidas (Reynolds et al. 2006).

A falha no desenvolvimento normal da placenta pode resultar de lesões primárias no endométrio da égua. Éguas com lesões endometriais acentuadas, como a fibrose, não são capazes de suportar o normal desenvolvimento dos microcotilédones placentários e, frequentemente, abortam durante o primeiro trimestre devido a insuficiência placentária (Schlafer 2004). A presença de fibrose no endométrio (endometrose) das éguas é uma consequência inevitável do envelhecimento, mesmo em éguas que nunca foram utilizadas na reprodução (Ricketts and Alonso 1991). De facto, a endometrose é uma das principais razões para a redução da fertilidade em éguas com mais de 12 anos (Pycok 2009).

Quaisquer deficiências na função placentária podem refletir-se em défices correspondentes de crescimento e maturação fetal (Wilsher and Allen 2003), visto que, o feto é particularmente sensível a pequenas alterações no fornecimento de nutrientes (Ousey et

al. 2012). O fluxo sanguíneo uterino é crítico no aporte de nutrientes ao feto. No entanto, a capacidade de transporte da placenta, a transferência de nutrientes, a superfície placentária e a sua vascularização também desempenham um papel importante no que respeita à nutrição e ao desenvolvimento intra-uterino (Fowden et al. 2000; Reynolds et al. 2006).

3. Objetivos propostos

Sobretudo em éguas idosas, o aumento das fibras de colagénio no endométrio predispõe para a sub-fertilidade e infertilidade. Como a presença de colagénio no endométrio está também associada à fibrose no oviduto da égua (Pinto-Bravo et al. 2018), surgiu a hipótese de poder acontecer o mesmo na placenta. Desta forma, a presença de colagénio na placenta equina poderá contribuir para um menor rácio entre o peso da placenta e o peso do poldro à nascença. Tanto quanto sabemos, este é um trabalho inovador na placenta da égua. Como tal, o objetivo principal deste projeto foi avaliar a presença de fibras de colagénio na placenta da égua, com o aumento da idade, e avaliar a sua possível relação com o peso do neonato. O presente estudo tem como objetivos específicos, os seguintes:

- 1) Avaliar a placenta e as membranas fetais *post-partum*, registando o seu peso;
- 2) Registar o peso do poldro 24h após o parto;
- 3) Avaliar quantitativamente os níveis de mRNA de colagénio de tipo I (*COL1A1*, *COL1A2*), colagénio de tipo III (*COL3A1*) e colagénio de tipo V (*COL5A1*), no corno grávido, não-grávido e no corpo da placenta equina;
- 4) Determinar o colagénio total através do doseamento de hidroxiprolina;
- 5) Avaliar qualitativamente as áreas na placenta ocupadas por COL1 ou COL3, com recurso à luz polarizada por microscopia ótica.

Parte II- Revisão bibliográfica

1. Anatomia da placenta

A placenta é um órgão muito complexo e de importância vital na gestação equina. É responsável pela interface entre a parte materna e a parte fetal. Este órgão permite a nutrição do feto através de trocas metabólicas de nutrientes, aporte de oxigénio e eliminação de detritos, conferindo a proteção contra as agressões internas e externas, bem como a produção e/ou a metabolização de várias hormonas (Pozor 2016).

A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e não-decídua. É do tipo epiteliocorial, o que quer dizer que o epitélio uterino está em contacto direto com a superfície coriônica. Desta forma, apresenta seis camadas de tecido que separam a circulação materna da circulação fetal (Caixeta et al. 2008; McKinnon et al. 2011). Como tal, a circulação materna é mantida em estreita aposição com a circulação fetal através da placenta. No entanto, mantém-se a separação entre os dois sistemas circulatórios durante toda a gestação (Enders and Blankenship 1999). A classificação difusa justifica-se devido à uniforme distribuição das vilosidades do córion por toda a superfície materna. Por fim, a característica não-decídua deve-se ao facto de não ocorrer perda de tecido materno durante o parto, visto que os microcotilédones se soltam e a mucosa uterina permanece intacta (Caixeta et al. 2008; McKinnon et al. 2011).

2. Histologia da placenta

No início da gestação, os tecidos extraembrionários desenvolvem-se lentamente e estabelece-se uma placenta coriovitellina. Com a progressão da gravidez começam a surgir pequenas vilosidades no saco coriônico (Bacha and Bacha 2012). As vilosidades evoluem e ramificam-se de forma a formarem microcotilédones placentários que se interdigitam com o endométrio materno. Cada microcotilédone é suprido por uma artéria do lado maternal e por uma artéria placentária, de dimensões equivalentes, do lado fetal para maximizar as trocas hemáticas (Steven and Samuel, 1975). O microplacentoma é a união do microcotilédone fetal com a microcarúncula materna. Esta disposição maximiza a área de contacto entre os epitélios fetal e materno, aumentando a área disponível para as trocas hemotróficas (McKinnon et al. 2011).

As glândulas endometriais mantêm-se funcionais durante toda a gestação e produzem secreções exócrinas para os espaços entre os microcotilédones adjacentes (Allen 2001). O epitélio trofoblástico pseudoestratificado especializado encontra-se em contacto íntimo com o lúmen das glândulas endometriais e absorve as secreções glandulares ricas em proteína (McKinnon et al. 2011).

A membrana corioalantóide organiza-se da seguinte forma (Sebastian and Benirschke 2007):

- 1) Uma parte externa (**Figura 1- I**) composta por:
 - 1.1) as vilosidades coriônicas (**Figura 1- A**), formadas por um revestimento externo de epitélio trofoblástico e com um eixo de tecido conjuntivo;
 - 1.2) o córion (**Figura 1- B**) com o epitélio corial ou trofoblasto e com o tecido conjuntivo da placa corial.
- 2) Uma parte interna (**Figura 1- II**), a alantóide, que contém:
 - 2.1) o tecido conjuntivo alantoideu (cuja face mais externa se cola à face interna da placa corial, embora em alguns locais haja um espaço) (**Figura 1- C**);
 - 2.2) a membrana alantoideia (**Figura 1- D**), composta por:
 - a) uma fina camada de tecido conjuntivo mais interna, por vezes separada do tecido conjuntivo alantoideu por um espaço, designado espaço exocelômico ou celoma extra-embrionário (**Figura 1- E**);
 - b) o epitélio alantoideu, simples de células cúbicas (Schlafer 2004) (**Figura 1- seta**).

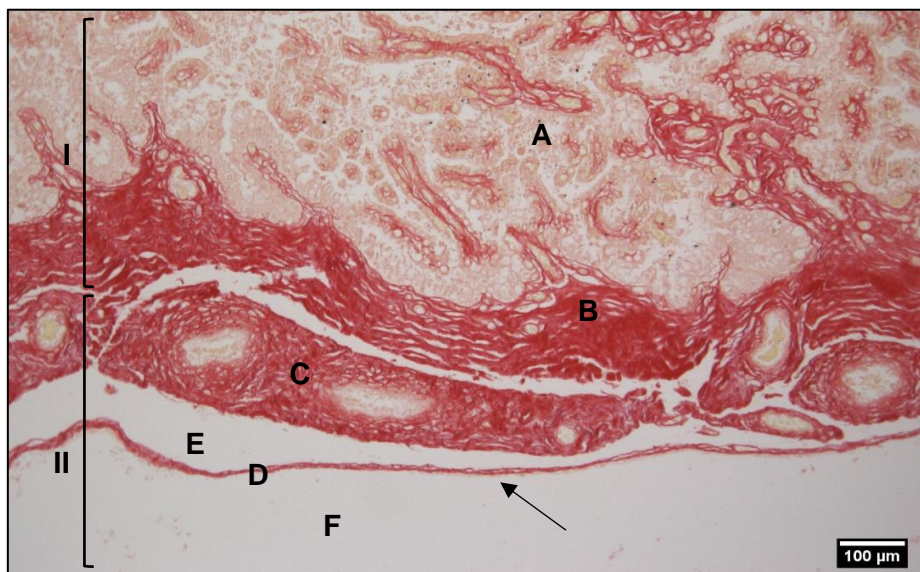


Figura 1. Corte histológico de corioalantóide equina corado por Picrosirius Red.

Legenda: Visualização em campo claro. Parte externa (I) e parte interna (II). Vilosidades coriônicas (A); placa corial (B); tecido conjuntivo alantoideu (C); membrana alantoideia (D); espaço exocelômico (E); área correspondente à cavidade alantoideia (F); epitélio alantoideu (seta).

3. Breve fisiologia da gestação

A gestação equina tem uma duração de 331-350 dias (Bacha and Bacha 2012). Quando o embrião entra no útero, aproximadamente, ao dia 5,5 pós-fertilização (Reilas et al. 2016), a sua nutrição depende unicamente das secreções produzidas pelas glândulas endometriais. O histotrofo é responsável pela nutrição do conceito até a corioalantóide se

começar a desenvolver e invadir o endométrio (McKinnon et al. 2011). Para além de nutrir o embrião, as glândulas endometriais são essenciais para a produção de fatores de crescimento e proteínas que preparam o endométrio para a gestação e induzem o desenvolvimento das membranas fetais (Allen 2001; Wilsher et al. 2019). Depois da entrada do concepto no lúmen uterino, este mantém-se solto até ao dia 17, quando se fixa à base de um dos cornos uterinos, o que é facilitado pelo aumento da tonicidade do miométrio (Enders and Liu 1991).

A partir do dia 40, desenvolve-se uma microvilosidade que estabelece a ligação entre o trofoblasto e o epitélio do endométrio (Samuel et al. 1975). A formação de pregas progressivas, o alongamento e as ramificações desta microvilosidade primária nos 80-100 dias seguintes vão dar origem aos primeiros microcotilédones, como referido anteriormente (Wilsher and Allen 2003). Com a contínua expansão da placenta por todo o útero, milhares de vilosidades coriônicas desenvolvem-se e penetram as microcarúnculas endometriais, levando ao aparecimento de microcotilédones placentários totalmente diferenciados (Schlafer 2004). Estes fixam de uma forma firme a corioalantóide ao epitélio uterino (Hafez and Hafez 2004). A placenta equina continua a crescer e a aumentar a sua complexidade até, aproximadamente, ao dia 150 da gestação, onde atinge a total maturidade e funcionalidade (Caixeta et al. 2008).

Apesar da complexidade desta estrutura, a transferência de nutrientes através das seis camadas que separam a circulação materna da fetal é relativamente reduzida. Como tal, toda a superfície coriônica tem de estar sempre em íntimo contacto com a mucosa do endométrio para suportar a gestação equina (Pozor 2016). Qualquer alteração na superfície do endométrio ou da corioalantóide poderá resultar em perda ou compromisso do feto. Assim, é essencial uma placenta bem estruturada e perfeitamente funcional para uma gestação normal e para o desenvolvimento de um feto saudável (Wilsher and Allen 2003).

4. Avaliação da placenta *post-partum*

O aspeto mais importante na avaliação da placenta é a sua integridade e, possivelmente, a identificação de alguma lesão patológica na superfície fetal ou no cordão umbilical (Pozor 2016). Como tal, a avaliação das membranas fetais não deve estar limitada apenas a casos de aborto ou de nado-morto (Chenier 2011). Na espécie equina, o peso normal da placenta *post-partum* é, aproximadamente, 11% do peso do poldro à nascença, variando entre 2,2 a 6,4 Kg (Schlafer 2004). A corioalantóide é normalmente expulsa intacta e do avesso (com a face coriônica internamente e a face alantoideia externamente). A melhor forma de verificar se a placenta está completa é dispô-la na forma de F (**Figura 2**).

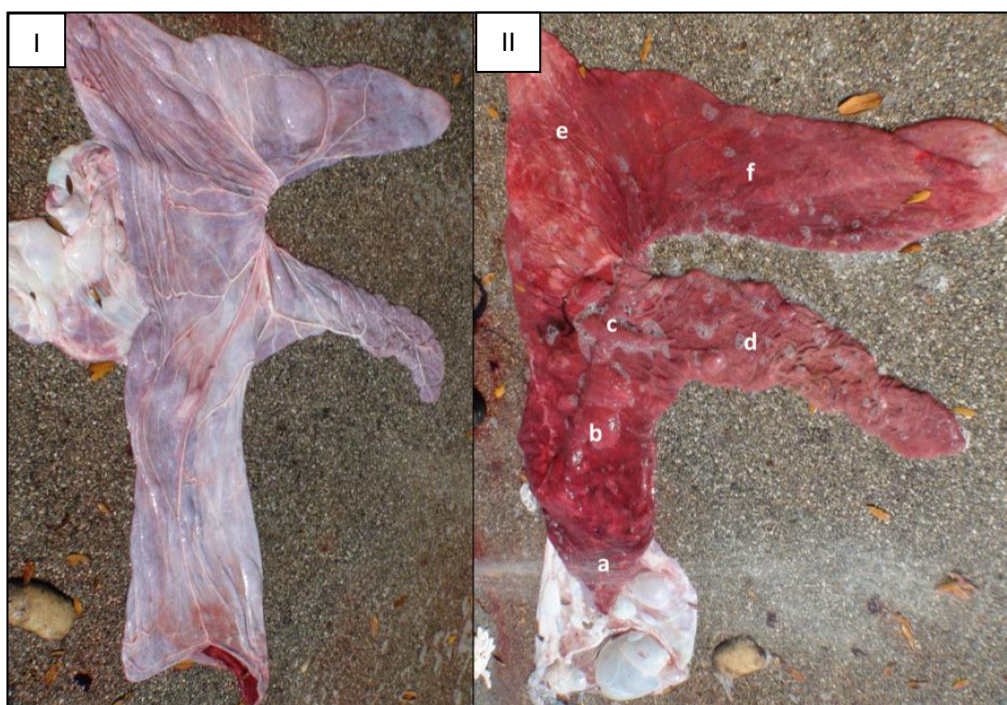


Figura 2. Corioalantóide equina disposta em F.

Legenda: Face alantoideia (I); face coriônica (II). As porções da corioalantóide são designadas de acordo com as estruturas uterinas correspondentes: estrela cervical (a); corpo da placenta (b); base do corno não-grávido (c); corno-não grávido (d); base do corno grávido (e); corno grávido (f). Adaptado de Pozor, 2016.

Devem-se examinar as duas superfícies, sendo que a face alantoideia deve ser branca, brilhante e lisa (**Figura 2-I**) e a face coriônica deve ser vermelha com uma superfície aveludada (**Figura 2-II**) (Pozor 2016).

Há diferenças entre o corno grávido e o corno não-grávido. O corno grávido apresenta edema evidente na sua ponta, exibe uma cor mais brilhante, é maior, mais suave e espesso do que o corno não-grávido (**Figura 2-II-f**). Como está mais distendido, as vilosidades são curtas e menos densas, enquanto que no corno não-grávido são mais densas e compridas (Schlafer 2004). Já o corno não-grávido apresenta-se mais acastanhado e, normalmente, mas nem sempre, é mais pequeno, enrugado e menos espesso que o corno grávido (**Figura 2-II-d**) (Pozor 2016).

A avaliação da placenta *post-partum* deve incluir igualmente as suas membranas fetais (Volkmann 2005). Nos equinos, o cordão umbilical (com origem no umbigo fetal e implantação na superfície alantoideia) é relativamente longo e dividido em segmento amniótico (que contém o uraco) e alantóico. Deve ser estendido, examinado e medido, sendo que, o comprimento médio do cordão umbilical de um feto de termo de raça Puro Sangue Inglês é cerca de 55 cm (Schlafer 2004). O âmnio envolve o feto e contém o fluido amniótico. Este não está fixo à corioalantóide, o que contribui para uma ligeira torsão dos vasos do cordão umbilical. O âmnio deve ser estendido de forma a permitir que as duas

superfícies possam ser examinadas. Deve apresentar-se sob a forma de uma membrana branca e fina (Volkman 2005).

A estrela cervical é uma zona da placenta sem vilosidades, a qual merece especial atenção visto ser a porção que está em contacto direto com o cérvix (**Figura 2-II-a**). Corresponde à primeira parte da placenta a ser rompida no início do parto (Schlafer 2004).

5. Patogénese da fibrose

O tecido fibrótico é caracterizado pela deposição excessiva de componentes da matriz extracelular (MEC), como o colagénio, a fibronectina e o ácido hialurónico, devido à ativação, proliferação e acumulação de fibroblastos e miofibroblastos (Hinz et al. 2007). Desta forma, o tecido fibrótico pode desregular o normal funcionamento e a arquitetura de um órgão (Weber 2000).

A fibrose desenvolve-se a partir de um processo inflamatório crónico, no qual, tanto os mecanismos de imunidade inata como de imunidade adquirida desempenham um papel importante (Van Linthout et al. 2014). Isto é, na fibrose há uma resposta imunitária que persiste por um longo período de tempo, onde a inflamação e a remodelação tecidular ocorrem simultaneamente (Wynn 2007). A lesão num tecido pode resultar de vários estímulos, tais como, microrganismos patogénicos, reações auto-imunes, toxinas, radiação e lesão mecânica. Depois da agressão tecidular, as células lesadas e as células do sistema imunitário produzem citocinas pró-fibróticas, fatores de crescimento, enzimas proteolíticas e fatores angiogénicos que, através de um sistema celular de sinalização parácrina, ativam várias células do sistema imunitário. Os fibroblastos uma vez ativados diferenciam-se em miofibroblastos que, por sua vez, iniciam a deposição de componentes do tecido conjuntivo, remodelando e destruindo progressivamente a arquitetura do tecido (Wynn 2008).

O processo fibrótico hepático envolve duas fases distintas: uma fase regenerativa, em que as células lesadas são substituídas por células do mesmo tipo, sem deixar evidência de lesão; e uma fase conhecida como fibroplasia ou fibrose, onde o tecido conjuntivo substitui o parênquima normal, resultando numa cicatriz permanente (Schuppan et al. 2001).

5.1. Imunidade inata não-específica

Os neutrófilos são das primeiras células a chegarem ao local lesado e desempenham um papel importante na defesa contra infeções e em processos inflamatórios não infecciosos. São ativados por citocinas e quimiocinas e, no tecido lesionado, produzem igualmente diversas citocinas inflamatórias e quimiocinas que potenciam o processo inflamatório (Ma et al. 2013; Van Linthout et al. 2014). Para além de numerosas citocinas pró-inflamatórias, os neutrófilos secretam grânulos que contêm diversas enzimas, tais como, mieloperoxidase,

metaloproteinases de matriz (MMPs), elastase, proteases e catepsina G. Estas são capazes de clivar componentes do colagénio e componentes não-colagénios do tecido conjuntivo, participando de forma relevante na remodelação tecidual durante o processo fibrótico (Ma et al. 2013). No entanto, a infiltração excessiva ou o atraso na sua eliminação pode exacerbar a resposta inflamatória. De facto, se os neutrófilos não forem removidos, aquando da sua morte, desintegram-se e libertam mediadores inflamatórios e proteinases que podem levar à destruição tecidual ou a reações de auto-imunidade (Bratton and Henson 2011). Há que referir que, durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos desenvolvem também um papel pró-fibrótico através da ativação de macrófagos e da libertação de espécies reativas de oxigénio (Lefkowitz and Lefkowitz 2001).

As plaquetas são também das primeiras células a chegarem ao local da lesão e quando ativadas sintetizam *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), que é um potente agente quimiotático, e *Transforming Growth Factor type β* (TGF- β) que estimula a deposição de MEC (Sinno and Prakash 2013). Além disso, a desregulação na cascata da coagulação pode também contribuir para o processo de fibrose (Chambers 2008).

Para além da atividade fagocitária inata e de defesa contra os microrganismos patogénicos, os macrófagos são células indispensáveis ao processo de remodelação tecidual. Produzem vários tipos de MMPs (MMP-2, -9 e -12), assim como os seus supressores endógenos, *Tissue Inhibitors of MMPs* (TIMPs). As MMPs coordenam a degradação da MEC. Como tal, o balanço correto entre MMPs e TIMPs é crucial para a normal deposição e degradação de MEC. Para além das MMPs, os macrófagos produzem também diversas quimiocinas (IL-12 e IL-23), fatores de crescimento (incluindo, PDGF) e TGF- β , que amplificam a resposta inflamatória e promovem a fibrose (Murray and Wynn 2011).

O TGF- β é uma citocina que desempenha um papel essencial em processos fisiológicos. No entanto, pode também participar na fibrose progressiva dos tecidos (Desmoulière 1995). Num estudo desenvolvido por Roberts et al. (1986), a injeção subcutânea de TGF- β 1 em ratos recém-nascidos resultou na deposição de colagénio e numa resposta fibrótica localizada. De facto, o TGF- β é considerado um dos principais mediadores pró-fibróticos envolvidos na patogénese da fibrose devido à sua presença em tecidos fibróticos de modelos animais e às suas ações pró-fibróticas, tais como: indução da migração de fibroblastos, transição epitelial-mesenquimal, inibição de MMPs através do aumento da expressão de TIMPs e estimulação direta da síntese de fibras de colagénio pelos miofibroblastos (Olman 2009). Além disso, vários estudos demonstram o efeito direto desta citocina na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Desmoulière 1995; Meyer-ter-Vehn et al. 2006; Bronnum et al. 2013).

Os eosinófilos também secretam TGF- β , proteínas granulares, particularmente, *Major Basic Protein* (MBP) e peroxidase eosinofílica, estando estes fatores envolvidos na

remodelação tecidual e fibrose. O TGF- β produzido pelos eosinófilos induz, igualmente, a ativação dos fibroblastos e a diferenciação em miofibroblastos (Aceves and Ackerman 2009). Outras células, tais como os mastócitos, produzem várias proteases, citocinas, fatores de crescimento, agentes vasoativos, triptase e TGF- β , que são responsáveis pela ativação de fibroblastos e consequente fibrose cardíaca (Levick et al. 2009).

5.2 Imunidade adquirida específica

As células do sistema de imunidade adquirida também desempenham um papel importante na patogénese da fibrose. O efeito pró-fibrótico dos linfócitos T depende dos fatores presentes no local da lesão, sendo que, a sua ativação é determinante no desenvolvimento da fibrose (Van Linthout et al. 2014).

Os linfócitos T-*helper* tipo 1 (Th-1) produzem o interferão γ (IFN- γ) que tem um papel controverso na inflamação e fibrose, visto que, parece desempenhar tanto efeitos pró-fibróticos como anti-fibróticos (Edward et al. 2001). O IFN- γ potencia a sua atividade fibrótica através da produção de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, como o *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α). Este promove a proliferação de fibroblastos e a deposição de colagénio (Piguet et al. 1989).

Os linfócitos T-*helper* tipo 2 (Th-2) produzem interleucinas (IL-4 e IL-13) que estão associadas ao processo de cicatrização e fibrose hepática (Henderson and Iredale 2007). De facto, a IL-13 é um dos principais mediadores da fibrose (Fallon et al. 2000; Liu et al. 2012). Esta interleucina inibe a síntese de MMPs pelos fibroblastos e, consequentemente, diminui a degradação da MEC, resultando em excesso de deposição de colagénio (Bailey et al. 2012). Além disso, induz a síntese de TGF- β 1 pelos macrófagos e pode cooperar com o mesmo na indução da fibrose (Fichtner-Feigl et al. 2006).

Os linfócitos B são células responsáveis pela produção de anticorpos e apresentação de antígenos. Contudo, também participam ativamente no processo inflamatório ao produzirem várias citocinas (Lund 2008). Um estudo desenvolvido em fibroblastos dérmicos humanos, ilustrou que as células B são importantes indutores de colagénio através da produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, tais como, IL-6, *C-C Motif Chemokine Ligand 2* (CCL2) e TGF- β . Promovem também a expressão de TIMP-1 e de MMP-9 que estão envolvidos na remodelação da MEC (François et al. 2013).

5.3 Fibroblastos e miofibroblastos

A MEC é constituída por quatro tipos de moléculas principais: os colagénios, as glicoproteínas estruturais (fibronectina e laminina), a elastina e os proteoglicanos. Os colagénios são componentes estruturais muito importantes da MEC (Amenta et al. 1986). São

um grupo de proteínas heterogêneas, mas intimamente relacionadas umas com as outras, sendo que estão descritos, pelo menos, 28 tipos geneticamente distintos (Ricard-Blum 2011).

Os fibroblastos são tradicionalmente reconhecidos pelo seu papel estrutural de síntese e remodelação da MEC. No entanto, são capazes de responder e sintetizar citocinas e fatores de crescimento (Van Linthout et al. 2014). A ativação e a proliferação de fibroblastos são eventos chave no processo de reparação tecidual, caracterizados pela produção de colagénio de tipo I, colagénio de tipo III, fibronectina, elastina, proteoglicanos e laminina (Chambers et al. 1998). Há várias células do sistema imunitário inato que podem promover a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, como referido anteriormente (Meneghin et al. 2007). Sendo que, durante o processo patológico, os fibroblastos representam aparentemente a maior fonte de miofibroblastos. No entanto, dependendo do órgão e do tipo de lesão, outras células podem-se tornar os seus principais precursores (Bochaton-Piallat et al. 2016), como é o caso dos queratócitos no olho (Torricelli et al. 2016), das células perisinusóides no fígado (Friedman 2010) e dos pericitos em inúmeros órgãos (Kramann et al. 2015).

Os miofibroblastos são consideradas células contráteis não-musculares (Gabbiani et al. 1972) e expressam α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) (Skalli et al. 1986). Têm um papel essencial na síntese de componentes da MEC (colagénio dos tipos I e III) e na geração de forças tecidulares, resultando na reorganização da MEC e contração tecidual (Serini and Gabbiani 1999). Estas células são ativadas por uma variedade de mecanismos, incluindo a sinalização parácrina de linfócitos e macrófagos, fatores autócrinos produzidos pelos próprios miofibroblastos e *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) produzidos por microrganismos patogénicos que interagem com recetores específicos dos fibroblastos (Wynn 2008). A ativação de miofibroblastos é essencial na reparação fisiológica ou patológica de tecidos. No entanto, se a sua proliferação se tornar persistente, produzem componentes da MEC de forma exagerada e descontrolada, podendo levar à disfunção do órgão (Hinz et al. 2007; Hinz et al. 2012). De facto, o mediador celular chave do processo fibrótico é o miofibroblasto, que quando ativado é a principal célula produtora de colagénio (Wynn 2008).

6. Fibrose no trato genital feminino

6.1 Fibrose no endométrio

A presença de bactérias no endométrio da égua leva ao aparecimento de neutrófilos sistémicos no útero. Estes expulsam o seu DNA levando à formação de redes extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps*- NETs) (Rebordão et al. 2014). Contudo, enquanto as NETs combatem os microrganismos no útero da égua, a exposição contínua aos seus constituintes (mieloperoxidase, elastase e catepsina G) pode contribuir para a deposição

de colagénio através do aumento de TGF β e TIMP-1. De facto, em ensaios *in vitro*, quando explantes de endométrio de égua foram expostos à mieloperoxidase, elastase ou catepsina G houve um aumento dos níveis de transcrição de colagénio de tipo I (Rebordão et al. 2013a). Os mesmos autores sugerem também o possível envolvimento de citocinas pró-fibróticas, como *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), interleucinas e prostaglandinas. A exposição *in vitro* do endométrio da égua a componentes das NETs e à CTGF levou a um aumento da produção de prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}), com ação pró-fibrótica (Rebordão et al. 2013b), e a uma diminuição da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que tem um papel anti-fibrótico, assim como, a um aumento da transcrição de colagénio de tipo I (Rebordão et al. 2014). Em casos de endometrites recorrentes, a alteração da produção de PGF_{2 α} pode não só causar luteólise e morte embrionária precoce, como pode também estar relacionada com o surgimento de fibrose no endométrio através da estimulação da deposição de colagénio (Rebordão et al. 2014).

Num estudo mais recente, o aumento da produção de colagénio de tipo I *in vitro* pelo endométrio equino foi estimulado pela enzima elastase presente nas NETs (Rebordão et al. em 2018). Como a elastase é uma enzima que regula a fibrose e a libertação das prostaglandinas, a sua inibição com inibidores específicos pode reduzir o estabelecimento de fibrose no endométrio, através da inibição de produção de colagénio tipo I e de PGF_{2 α} , e através da estimulação da produção de PGE₂ (Amaral et al. 2018; Amaral et al. 2020).

Noutro estudo *in vitro* realizado no nosso laboratório, foi observado um aumento na transcrição genética do recetor de TGF- β 1 e do colagénio dos tipos I e III no endométrio da égua, sugerindo a sua ligação com a deposição patológica de proteínas de colagénio características de fibrose (Rebordão et al. 2013a). Qualquer das doses de TGF- β 1 utilizadas neste estudo induziu a transcrição de mRNA de colagénio do tipo I α 1 e de colagénio do tipo III α 1 por fibroblastos endometriais equinos (Szóstek-Mioduchowska et al. 2019). Os mesmos autores concluíram que, a citocina TGF- β 1 pode estar envolvida na patogénese da endometrose equina através da indução da diferenciação de miofibroblastos, aumento da produção de componentes da MEC e pela estimulação da proliferação de fibroblastos. Szóstek-Mioduchowska et al. 2019 demonstraram ainda que a presença de miofibroblastos está diretamente correlacionada com a gravidade da endometrose equina.

Em processos fibróticos e de reparação de tecidos no endométrio, o colagénio de tipo III é o primeiro a ser formado (predominante em endométrio saudável), sendo gradualmente substituído por colagénio de tipo I, com o aumento das alterações fibróticas (Masseno 2009; Costa 2015). Como tal, o rácio colagénio tipo I/III depende do grau de endometrose (Raila 2000). Num estudo mais recente, foi registado um aumento do COL1 em endométrio com endometrose grave comparativamente a endométrio saudável com ligeiras alterações fibróticas, onde o COL3 foi o tipo predominante (Pinto-Bravo et al. 2018).

Além do envolvimento dos neutrófilos, Skarzynski et al. (2020) sugerem o possível papel dos macrófagos e dos mastócitos na patogénese da endometriose equina como componentes da resposta imunitária inata não-específica. Estas células da primeira linha de defesa imunitária atuam contra microrganismos patogénicos, constituintes de plasma seminal, espermatozóides e infeções locais, produzindo citocinas de forma a reforçar a resposta imunitária.

6.2 Fibrose no oviduto

O embrião equino, ao contrário de outras espécies domésticas, permanece mais tempo no oviduto materno e atinge uma fase mais avançada de desenvolvimento antes de entrar no útero (Freeman et al. 1991). Como tal, é essencial que as éguas tenham um ambiente no oviduto saudável de forma a garantir um normal desenvolvimento embrionário. Está descrito que alterações no ambiente do oviduto, pelo estabelecimento de fibrose devido a processos inflamatórios ou infeções, induz uma lesão celular em roedores (Yang et al. 2015).

De modo idêntico ao que acontece no endométrio de éguas idosas com alterações degenerativas associadas a fibrose, foi descrita a presença de fibras de colagénio do tipo I no oviduto de éguas. Num estudo recente, os níveis de transcritos de mRNA de *COL1* apresentaram maior expressão no oviduto de éguas idosas (> 17 anos), enquanto que, a transcrição de mRNA de *COL3* foi superior em éguas mais novas (entre os 4 e os 8 anos de idade) (Pinto-Bravo et al. 2018).

Com o aumento da idade, tanto o colagénio do tipo I como o colagénio do tipo III aumentam no oviduto e no endométrio equino. Neste estudo, os autores sugerem que é possível que haja uma correlação entre a fibrose do endométrio e a fibrose do oviduto. Assim, a avaliação histopatológica do endométrio da égua pode fornecer informação adicional acerca da fibrose no oviduto, em casos onde uma biópsia para fins de diagnóstico não pode ser realizada (Pinto-Bravo et al. 2018).

6.3 Fibrose na placenta

Tanto quanto sabemos, este será o primeiro estudo a quantificar fibras de colagénio na placenta equina, relacionando-as com as diferentes porções da placenta, idade das éguas e peso dos poldros. No entanto, há alguns estudos desenvolvidos em placentas humanas. O colagénio presente na placenta humana não está apenas relacionado com o desenvolvimento normal da placenta, mas também está associado a complicações metabólicas da função placentária (Hirayama 1983).

Em 1990, Rukosuev et al. estudaram a distribuição da fibronectina e do colagénio dos tipos I, III, IV e V em vilosidades fibróticas na placenta humana de gestações patológicas, através de imunofluorescência indireta. Foi encontrada uma quantidade significativa de colagénio dos tipos IV e V e uma menor quantidade de colagénio dos tipos I e III, sendo que, os resultados indicam que tanto o colagénio dos tipos I, III, IV e V estão ativamente envolvidos na formação do processo fibrótico das vilosidades coriônicas da placenta humana. De forma idêntica, foi demonstrado um aumento do colagénio tipo IV nas vilosidades de placentas humanas com insuficiência placentária. A alteração na síntese de colagénio do tipo IV leva a alterações estruturais das vilosidades e do seu estroma, assim como, de áreas perivasculares e vasos sanguíneos, o que contribui para a disfunção placentária e alterações hemodinâmicas da placenta (Khozhai et al. 2010). De facto, a fibrose no estroma é uma lesão histológica característica de insuficiência placentária (Fox 1978).

O colagénio do tipo I é a unidade básica estrutural da placenta humana de termo e está presente sob a forma de fibras cruzadas dispostas em grandes feixes. O colagénio do tipo III está presente sob a forma de rede que encapsula as fibras de colagénio tipo I. Além disso, o colagénio dos tipos V e VI estão associados intimamente às fibras de colagénio dos tipos I e III (Amenta et al. 1986). Este estudo sugere que, enquanto o colagénio tipo I é a unidade básica estrutural, os restantes componentes da MEC atuam como pontes de ligação entre as fibras de colagénio tipo I e outras estruturas (células do estroma e membrana basal). Desta forma, ligeiras alterações nos diferentes componentes da MEC podem resultar em alterações das propriedades da mesma. As alterações na composição do colagénio durante o desenvolvimento e envelhecimento da placenta humana com o avançar da gestação, podem ter um papel importante no fornecimento de nutrientes ao feto e na manutenção da gestação (Iwahashi et al. 1996). As deficiências na estrutura e na função placentária podem refletir-se em comprometimento do desenvolvimento e crescimento fetal durante a gestação humana, denominado Restrição de Crescimento Intra-Uterino (RCIU). Na RCIU a mortalidade e a morbilidade perinatal aumentam com a diminuição do peso do bebé ao nascimento (Pollack and Divon 1992).

7. Sub-fertilidade/ infertilidade em éguas idosas

É inevitável o declínio da fertilidade e da capacidade de manter uma gestação com o aumento da idade (Morris and Allen 2002). O envelhecimento celular resulta do efeito conjunto do “relógio” molecular geneticamente controlado da célula e do ambiente lesado onde esta se encontra, frequentemente designado por “*wear and tear*”. Isto é, a vida útil da célula é regulada por um equilíbrio entre uma lesão a que está continuamente sujeita e a capacidade da célula para reparar esse dano. Entre várias, a hipótese mais aceite, envolve o

dano celular por radicais livres de oxigénio. A exposição repetida da célula a radicais livres de oxigénio leva a lesão no DNA mitocondrial e nuclear (LeBlanc and Causey 2009).

Num estudo desenvolvido por Davies Morel et al. (2005), foi demonstrado que éguas mais velhas apresentam taxas de gestação mais baixas quando comparadas com éguas mais novas. Em 2007, num estudo retrospectivo desenvolvido por Allen et al., em éguas Puro Sangue Inglês, é indicado que o maior fator limitante às esperadas elevadas taxas de fertilidade em éguas com manejo correto é o avanço da idade (>13 anos).

A morte embrionária precoce ocorre antes dos 40 dias de gestação. A mortalidade fetal precoce ocorre antes dos 150 dias de gestação, enquanto que a morte fetal tardia ocorre depois dos 150 dias. O aborto consiste na expulsão do feto e das membranas antes dos 300 dias de gestação, sendo que, a partir dos 300 dias é considerado nado-morto (Pycock 2009).

7.1 Anomalias do oviduto

As alterações do oviduto são situações raras em éguas. No entanto, Fiala-Rechsteiner et al. (2015), citando Saltiel et al. (1986), referem que a salpingite é frequentemente observada com o aumento da idade das éguas em tratos genitais recolhidos *post-mortem*. É mais evidente em éguas não-gestantes do que nas gestantes, sugerindo que estas lesões podem ter influência na capacidade da égua em ficar gestante.

O bloqueio do oviduto em éguas idosas tem vindo a ser documentado desde o início dos anos 60. Inicialmente, julgou-se que a obstrução do oviduto seria devido à presença de uma massa fibrosa com origem na mucosa do mesmo (Tsutsumi et al. 1979). Foi realizado um estudo em 2006 por Allen et al., com éguas inexplicavelmente inférteis, entre os 10 e os 21 anos de idade, que após tratamento com PGE₂ ficaram gestantes nessa época reprodutiva ou na seguinte. Os autores concluíram que o bloqueio do oviduto ocorre esporadicamente em qualquer grupo de éguas idosas e resulta da movimentação intraluminal de detritos previamente acumulados, ao invés de tecido fibroso, como se pensava até então. Contudo, alterações no ambiente do oviduto também contribuem para perda embrionária precoce e, consequentemente, infertilidade (Carnevale 2008).

Num estudo realizado mais recentemente, verificou-se um aumento de fibras de colagénio tanto no oviduto como no endométrio de éguas idosas (Pinto-Bravo et al. 2018).

7.2 Angioesclerose da vasculatura uterina

A angioesclerose é caracterizada como o aumento da deposição de tecido conjuntivo fibroso e/ou fibras elásticas nas paredes dos vasos sanguíneos (Schoon and Schoon 2003).

A incidência e a gravidade da angioesclerose uterina nas éguas aumenta com o avanço da idade e com o número de gestações (Gruninger et al. 1998). Neste estudo, em

éguas idosas nulíparas, foram observadas mais alterações angioscleróticas caracterizadas por esclerose perivascular leve a moderada na túnica íntima de vasos arteriais e venosos de grande e de pequeno calibre, quando comparadas com éguas novas nulíparas. Além disso, os mesmos autores referem que ocorre remodelação vascular, possivelmente, devido a alterações hemodinâmicas e hormonais durante a gestação e puerpério, onde há ciclos de crescimento vascular e subsequente involução *post-partum*. Isto pode indicar que os vasos têm reduzida capacidade de se adaptarem às necessidades exigidas pela circulação uterina durante a gestação. Num estudo realizado em 2008, Liu e colaboradores, referem que “a gravidade das lesões vasculares aumenta com a paridade e, portanto, com a idade da égua.” As éguas idosas múltiparas, têm 233 vezes mais probabilidade de desenvolver degenerescência vascular moderada a grave relativamente a éguas novas nulíparas.

A degenerescência vascular reduz, indiretamente, a fertilidade através da redução da perfusão do endométrio e através de perturbações na drenagem linfática uterina (LeBlanc and Causey 2009). Há também que referir que, éguas idosas e múltiparas com angioesclerose endometrial moderada a grave, podem ser identificadas como pacientes de risco de ruturas fatais de vasos extrauterinos no final da gestação ou no parto (Ludwig et al. 2001).

As alterações do fluxo sanguíneo uterino podem ainda ter implicações no desenvolvimento das glândulas endometriais, na contratilidade do miométrio, na resposta inflamatória e no correto desenvolvimento do concepto (Esteller-vico et al. 2010).

7.3 Endometrose

A endometrose é um processo crónico e irreversível, caracterizado pela degenerescência glandular e desenvolvimento de fibrose no endométrio da égua, diagnosticada por biópsia uterina. É uma doença progressiva consequente de alterações naturais associadas à idade, inflamação crónica, cópula, gestação, parto e involução uterina pós-parto (Kenney 1992). Esta patologia é uma das principais causas de sub-fertilidade/infertilidade em éguas e está associada a aumento do risco de morte embrionária e fetal (Kenney 1978; Rebordão et al. 2014). O prognóstico de fertilidade é reservado independentemente do tratamento a que a égua for sujeita (Pycock 2009).

A endometrose é definida como fibrose periglandular e/ou fibrose endometrial do estroma, podendo ser ativa ou inativa, destrutiva ou não-destrutiva. É independente dos mecanismos de controlo hormonais uterinos, isto é, as alterações endócrinas cíclicas e sazonais não têm efeito na progressão da doença (Hoffmann et al. 2009).

Assim como noutros órgãos, a fibrose pode ser uma sequela de processos inflamatórios crónicos (Olman 2009). Como tal, a inflamação persistente pode ter um efeito

acelerador do declínio da saúde uterina, e episódios repetidos de endometrite aguda em éguas suscetíveis podem levar a alterações degenerativas fibróticas (Hoffmann et al. 2009). No entanto, a etiologia e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda não são completamente conhecidos (Rebordão et al. 2014).

Em 1991, Ricketts and Alonso, sugeriram que havia uma correlação significativa entre a gravidade da endometrose e a idade da égua. Os resultados sugerem que, utilizando critérios histopatológicos usados por Kenney and Doig (1986), éguas até 9 anos de idade não costumam ter sinais de endometrose; éguas até aos 13 anos de idade podem apresentar ligeiros sinais; dos 13 aos 15 anos de idade não devem ter mais do que sinais moderados; e éguas com 17 ou mais anos de idades, provavelmente, apresentarão sinais graves de endometrose. Os autores defendem que esta é uma situação progressiva e inevitável e está mais associada aos efeitos da idade do que da multiparidade. De facto, a idade da égua, estudada isoladamente, é considerada um potencial fator etiológico responsável por alterações degenerativas do endométrio e início de endometrose (LeBlanc and Causey 2009; Woodward et al. 2012; Ebert et al. 2014).

Por outro lado, éguas com angioesclerose têm maior incidência e gravidade de endometrose (Gruninger et al. 1998). Além disso, devido à deficiência na circulação sanguínea uterina em éguas idosas com endometrose há um menor desenvolvimento dos microcotilédones placentários, o que pode contribuir para perda ou sub-desenvolvimento do feto (Ousey et al. 2012).

7.3.1 Avaliação de biópsia uterina e classificação do tipo de endométrio

A biópsia uterina é realizada para estimar a fertilidade da égua. A fertilidade entende-se como a capacidade de conceber, manter e levar uma gestação a termo (Kenney 1978). Esta técnica pode também ser utilizada para monitorizar a progressão de doenças, para controlar a resposta a um tratamento específico ou para providenciar informação acerca da morfogénese presente numa endometrite aguda infecciosa (Ricketts et al. 1978).

Depois de recolhida a biópsia de endométrio, procede-se à interpretação dos achados histológicos. Como alterações histopatológicas pode haver inflamação, infeção, fibrose, hipertrofia, glândulas quísticas, atrofia não-sazonal, hipoplasia, hiperplasia glandular, neoplasia, lacunas linfáticas, quistos não-glandulares e esclerose dos vasos sanguíneos (Kenney 1978).

A biópsia uterina na espécie equina foi usada pela primeira vez, a nível clínico, nos anos 60, depois do aparecimento de instrumentos apropriados e da publicação da primeira descrição de lesões do endométrio (Brandt and Manning 1969). Em 1978, Kenney

estabeleceu um sistema que dividia os tipos de endométrio em três categorias e providenciava uma estimativa da fertilidade da égua. O sistema foi revisto por Kenney and Doig (1986), que passou a considerar a inflamação e a fibrose do endométrio. As categorias são as seguintes:

- Categoria I: endométrio normal ou com ligeira inflamação local ou fibrose, sendo que, a égua é resistente a endometrite e tem mais de 80% de probabilidade de conceber e levar a gestação a termo.
- Categoria IIA: inflamação ligeira a moderada e/ou fibrose multifocal com uma a três camadas de fibroblastos a envolver as glândulas endometriais ou menos de dois “ninhos glandulares” por cada 5 mm de campo linear. A probabilidade da égua conceber e manter a gestação a termo é entre 50 e 80%;
- Categoria IIB: inflamação moderada e/ou multifocal ou fibrose difusa com quatro ou mais camadas de fibroblastos a envolver as glândulas ou dois a quatro “ninhos glandulares” por cada 5 mm de campo linear. A égua tem entre 10 a 50% de probabilidade de conceber e manter a gestação até ao fim;
- Categoria III: inflamação grave e/ou fibrose generalizada com cinco ou mais ninhos glandulares por cada 5 mm de campo linear. A égua é muito suscetível a endometrite e a probabilidade de conceber e levar uma gestação a termo é menor ou igual a 10%.

A classificação da biópsia do endométrio está diretamente relacionada com a saúde uterina e com a capacidade do útero levar uma gestação até ao fim (Kenney 1978). Também é possível que as alterações do endométrio estejam correlacionadas com a suscetibilidade da égua a endometrite induzida por inseminação (Woodward et al. 2012; Buczkowska et al. 2016).

7.3.2 Placentação

Em éguas idosas com endometrose o desenvolvimento da placenta está comprometido. Nas áreas da corioalantóide diretamente opostas às áreas de endométrio com alterações degenerativas, vão desenvolver-se menos vilosidades coriônicas e estas serão mais curtas, o que atrasará o normal desenvolvimento dos microcotilédones (Foote et al. 2012). O volume das trocas sanguíneas depende, particularmente, do tamanho dos microcotilédones. Deste modo, a capacidade de troca de gases e o fornecimento de nutrientes está limitado (Bracher et al. 1996; Abd-Elnaeim et al. 2006). Em consequência das alterações degenerativas no endométrio, a área efetiva de troca fetomaternal está reduzida, resultando em atraso no desenvolvimento intra-uterino, redução de ganho de peso do poldro ou até mesmo morte fetal (Bracher et al. 1996; Wilsher and Allen 2003; Abd-Elnaeim et al.

2006). Além disso, as éguas idosas com endometrose apresentam taxas de aborto mais elevadas do que éguas jovens (Ousey et al. em 2012).

A placenta pode conseguir compensar algum grau de fibrose através da alteração do desenvolvimento dos microcotilédones. Contudo, em éguas mais velhas com endometrose grave, uma adequada compensação será mais difícil (Wilsher et al. 2019). Em casos menos graves, quando a área de contacto entre a corioalantóide e o endométrio é reduzida, pode resultar um poldro mais leve e pequeno. Aliás, em éguas Puro Sangue Inglês, a área microscópica total de contacto fetomaternal está fortemente correlacionada com o peso do poldro à nascença (Wilsher and Allen 2003).

Um fluxo sanguíneo adequado da artéria uterina é fundamental para o aporte de nutrientes fetais. No entanto, a área superficial, a capacidade de transporte, o *uptake* de nutrientes e a vascularização da placenta também desempenham um papel importante na viabilidade e peso do poldro (Fowden et al. 2000; Reynolds et al. 2006). Por outro lado, como já referido anteriormente, as glândulas endometriais são responsáveis pela produção de fatores de crescimento e proteínas histotróficas essenciais ao desenvolvimento placentário. Uma atrofia glandular, resultante de danos endometriais graves, poderá resultar no desenvolvimento incompleto das vilosidades (Wilsher et al. 2019) e a corioalantóide no final da gestação pode ser mais pequena e mais leve (Wilsher and Allen 2003).

O facto de que a égua raramente é capaz de suportar uma gestação de gémeos, indica que toda a superfície materna do endométrio é essencial para otimizar a nutrição e o desenvolvimento fetal no útero (Bracher et al. 1996; Foote et al. 2012).

8. Patologia placentária e alteração dos níveis hormonais

Qualquer condição clínica que afete diretamente a placenta ou o feto, tais como, placentite, separação placentária ou alteração no fluxo sanguíneo umbilical, é provável que tenha efeitos prejudiciais na função endócrina da unidade fetoplacentária (Ousey 2006).

Durante os primeiros 150 dias da gestação, a progesterona (P_4) é produzida pelos corpos lúteos primário e secundários e é detetada em elevadas concentrações. A partir daí, os níveis descem (Pashen 1984). De facto, na última fase da gestação equina há muito pouca P_4 na circulação materna. Pensa-se que a quiescência do útero seja mantida por metabolitos de pregnenolona (P_5) e de P_4 , conhecidos como progestagénios, que são produzidos pelos tecidos uteroplacentários (Chavatte et al. 1997). A patologia placentária pode provocar a elevação prolongada dos níveis plasmáticos maternos de progestagénios muitas semanas antes do parto, e a análise dos mesmos, através de espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa, revelou diferenças dependendo da natureza do problema (Ousey et al. 2003). Em casos de éguas com sub-desenvolvimento dos microcotilédones, as

concentrações de P_4 estão elevadas, mas os níveis de P_5 e de vários metabolitos estão normais ou baixos, sugerindo que a placenta é menos capaz de metabolizar a P_4 em 5α -DHP e outros progestagénios. Por outro lado, em casos de placentite, os níveis de progestagénios descem rapidamente ou estão próximos de zero. Este padrão hormonal é de prognóstico muito reservado, uma vez que indica morte fetal ou expulsão fetal eminente. É uma situação aguda que pode acontecer também em casos de stress materno, torsão uterina ou cólica (Ousey 2006). Noutro estudo, Ryan et al. (1998) sugerem que a relaxina é um indicador de insuficiência placentária em éguas. A diminuição dos níveis séricos de relaxina está também associada ao sub-desenvolvimento dos microcotilédonos placentários. Como tal, os níveis plasmáticos de relaxina podem ser usados como marcador biológico da função placentária e do bem-estar fetal.

Parte III- Trabalho experimental

1. Materiais e métodos

1.1. Identificação de éguas

Imediatamente após o parto, foram recolhidas as placentas de dezasseis éguas (n=16) de diferentes raças (**Tabela 1**), da Coudelaria de Haras de La Gesse (Toulouse, França), durante o período reprodutivo decorrido entre Abril e Junho de 2019. As éguas tiveram acesso a água e feno *ad libitum*. O alimento concentrado foi administrado duas vezes por dia, cuja quantidade dependia das necessidades individuais de cada animal. Os animais foram mantidos na pastagem. Contudo, a partir dos 30 dias que antecederam a data prevista do parto, as éguas passaram a estar o dia no campo e a noite na box.

Tabela 1. Éguas utilizadas para a recolha de placentas.

Raças	Número (n)
PSL	10
French Trotter	2
Anglo-árabe	1
Hanoveriano	1
KWPN	1
Indeterminada	1

Legenda: PSL – Puro Sangue Lusitano; KWPN – *Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland*

Como um dos objetivos deste estudo foi avaliar a presença de fibras de colagénio na placenta equina com o aumento da idade, as éguas foram agrupadas em duas categorias de acordo com a idade. Sendo que, foram incluídas 7 éguas no grupo das mais novas com idades entre os 5 e os 9 anos (novas; n=7), e 9 éguas no grupo das mais velhas com idades iguais ou superiores a 10 anos (idosas; n=9) (**Tabela 2**). A média de idades no grupo das “éguas novas” foi $6,43 \pm 0,69$ (média \pm erro padrão) e no das “éguas idosas” foi $12,12 \pm 0,57$.

Tabela 2. Distribuição de éguas em “éguas novas” e “éguas idosas” consoante a idade.

Nº égua	Éguas novas (5-9 anos)	Éguas idosas (≥ 10 anos)
	19.18 (9 anos)	19.16 (14 anos)
	19.19 (5 anos)	19.17 (10 anos)
	19.22 (5 anos)	19.20 (11 anos)
	19.26 (6 anos)	19.21 (15 anos)
	19.27 (9 anos)	19.25 (12 anos)
	19.29 (5 anos)	19.28 (14 anos)
	19.33 (6 anos)	19.30 (11 anos)
	-	19.31 (11 anos)
	-	19.32 (12 anos)

1.2. Recolha de amostras

Imediatamente após a expulsão da placenta esta foi pesada, completamente estendida, disposta em F, fotografada e medida (consoante o formulário presente em **Anexo 1**). A placenta foi invertida de forma a deixar a face alantoideia do lado de dentro e a face coriônica do lado de fora, como durante a gestação. As diferentes regiões da placenta foram identificadas e denominadas de A a E fazendo-se a distinção entre as diferentes porções (superior e inferior) do corno grávido, corno não grávido e corpo da placenta (**Figura 3**).

De cada placenta foram obtidas amostras com, aproximadamente, 5 mm³, dos cinco locais diferentes (A a E). De cada uma destas áreas, foram recolhidas duas amostras: uma foi imersa em 1 mL de RNA Later[®] em criotubos para posterior extração de RNA e para determinação indireta de colagénio total por imuno-ensaio, e a segunda, em 5 mL de solução tamponada de formaldeído a 4% para análise histopatológica e histoquímica. As amostras de placenta em RNA Later[®] foram mantidas a 4°C durante 24h e depois armazenadas a -80°C até à realização dos ensaios laboratoriais. As porções de placenta em formaldeído a 4% foram mantidas à temperatura ambiente e posteriormente processadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

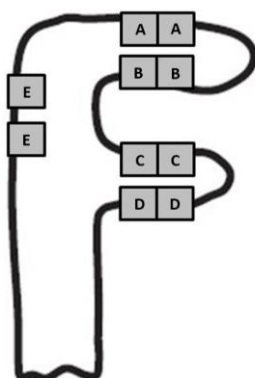


Figura 3. Esquema representativo da placenta de égua disposta em F.

Legenda: Local da colheita de amostras: **A** – corno grávido (parte superior); **B** – corno grávido (parte inferior); **C** – corno não-grávido (parte superior); **D** – corno não-grávido (parte inferior); **E** – corpo da placenta.

1.3. *Quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR)

Para os estudos de qRT-PCR procedeu-se primeiramente à extração de RNA e síntese de cDNA. Os tecidos de placenta foram utilizados para extração de RNA através do método dos álcoois. Procedeu-se inicialmente à maceração dos tecidos com lâmina de bisturi, adicionou-se reagente TRI[®] (T9424; Sigma) para romper as membranas citoplasmáticas e colocaram-se as amostras no Tissue Lyser[®]. Adicionaram-se depois, sequencialmente, clorofórmio, isopropanol e finalmente etanol a 75% para precipitar o RNA. Este último foi

dissolvido em água e a sua concentração e qualidade foram avaliadas no Nanodrop® (ND200C; Fisher Scientific, Hampton, PA, USA).

O RNA extraído a partir dos tecidos de placenta foi utilizado para a síntese de cDNA, através de transcrição reversa. Deste modo, ao RNA foram adicionados M-MLV Transcriptase Reversa (M170B, Promega®) de 1 µg de RNA total num volume de 20 µL, utilizando oligonucleótidos (C1101, Promega®) e um inibidor de RNases. Através da realização de ciclos com duração e temperaturas definidas, obteve-se o DNA de cadeia complementar ao RNA desejado. O cDNA obtido foi posteriormente utilizado em qRT-PCR.

O qRT-PCR foi utilizado para amplificar e quantificar a transcrição de mRNA de genes de colagénio dos tipos I, III e V (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1*). Foram desenhados *primers* específicos, assim como genes de referência, utilizando o programa *online* Primer-3 and Primer Premier Software (Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA, USA). Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizada na análise qRT-PCR.

Gene (número de acesso)	Sequência 5' – 3'	Pares de Base
COL1A1 (100033877)	Forward: TATGGAAACCCGAGCCCTG Reverse: ACTCCTGTGGTTTGGTCGTCTG	175
COL1A2 (XM_001492939.3)	Forward: CAAGGGCATTAGGGGACACA Reverse: ACCCACACTTCCATCGCTTC	196
COL3A1 (AF117954.1)	Forward: CAAAGGAGAGCCAGGAGCAC Reverse: CTCCAGGCGAACCATCTTTG	98
COL5A1 (100069057)	Foward: CGTCTCCCGTCTTCCTCT Reverse: TGCCGAACACGATGATGC	228
GAPDH (NM_001163856.1)	Forward: CACCCACTCTTCCACCTTCG Reverse: CTTGCTGGGTGATTGGTGGT	173

Legenda: **COL1A1**- colagénio de tipo I, α 1; **COL1A2**- colagénio de tipo I, α 2; **COL3A1**- colagénio de tipo III, α 1; **COL5A1**- colagénio de tipo V, α 1; **GAPDH**- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gene de referência).

Nesta técnica são produzidas múltiplas cópias de regiões específicas dos genes-alvo, através da utilização de *primers* que flanqueiam a região a amplificar e de uma mistura que contém a enzima (polimerase), os nucleótidos (dNTP's) e uma solução-tampão (Power Syber Green PCR Master Mix, Applied Biosystems®). A amplificação dos genes-alvo e dos genes de referência foi realizada no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, California, USA) depois da otimização das concentrações dos *primers*. Neste caso, foram amplificados em particular os seguintes genes: colagénio de tipo I, α 1 (*COL1A1*), colagénio de tipo I, α 2 (*COL1A2*), colagénio de tipo III, α 1 (*COL3A1*) e colagénio de tipo V, α 1 (*COL5A1*).

Antes de correr o ensaio, o gene de referência foi validado. De forma a determinar o gene de controlo interno mais estável foram considerados quatro potenciais genes validados: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), succinato desidrogenase complexo A, subunidade A, flavoproteína (*SDHA*), beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) e proteína ribossómica L32 (*RPL32*). O *GAPDH* foi o gene de controlo interno mais estável e, como tal, foi seleccionado como gene de referência do nosso ensaio.

A quantificação de mRNA foi analisada utilizando o *software* Real Time PCR Miner 4.0, depois de ser determinado o número de ciclo fracionário no limiar (CT) e o nível de eficiência do *primer* (E) para cada amostra. Com recurso à equação $[1/(1+E)^{CT}]$, todos os níveis de CT foram relacionados com o nível de eficiência do *primer* (Zhao and Fernald 2005). Os valores de expressão relativa foram calculados pela normalização do nível de expressão dos genes-alvo em relação ao nível de expressão do gene de referência.

1.4. Determinação da concentração de hidroxiprolina

Como nem sempre a transcrição de genes corresponde à quantidade de proteína (Vogel and Marcotte 2012), houve a necessidade de quantificar o colagénio total presente nas amostras de um modo indirecto. Isto é, através da determinação da concentração total de hidroxiprolina pelo método de imuno-ensaio enzimático (ABIN593448, Antibodies online).

A hidroxiprolina é um aminoácido formado pela hidroxilação pós-traducional da prolina. A regulação pós-transcricional, pós-traducional e de degradação contribui para a concentração de proteínas, pelo menos tanto quanto a própria transcrição (Vogel and Marcotte 2012). A hidroxiprolina é um componente principal do colagénio, visto que, permite a estabilização da sua estrutura helicoidal. Como tal, é restrita ao colagénio e a determinação da sua concentração pode ser usada como indicador da presença do mesmo (Junqueira and Carneiro 2013).

Primeiro, 10 mg de tecido placentário foram homogeneizados em 100 μ l de H₂O. Para 100 μ l de homogeneizado adicionou-se 100 μ l de HCl e levou-se à estufa durante 3 horas a 120°C. Seguidamente, realizou-se a curva *standard*, como indicado no kit, originando 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 μ g/poço de hidroxiprolina *standard*. A concentração de hidroxiprolina foi determinada pela reacção do 4-(Dimetilamino)benzaldeído (DMAB) com a hidroxiprolina oxidada. Por fim, obteve-se um produto colorimétrico proporcional à quantidade de hidroxiprolina presente na amostra que foi lido num espectrofotómetro com o comprimento de onda de 560 nm. Apenas foram utilizadas as porções A, C e E das amostras de placenta, uma vez que a transcrição dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1* não mostrou diferenças entre as porções A e B correspondentes ao corno grávido, e entre as porções C e D no corno não-grávido da placenta, conforme indicado na secção relativa aos Resultados.

1.5. Avaliação histológica qualitativa de COL1 e COL3 na placenta da égua

No Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, as amostras de placenta conservadas em formaldeído a 4% foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100%) e em xilol, sendo depois processadas para a obtenção de blocos em parafina. Obtiveram-se cortes histológicos de 4 µm corados com hematoxilina (05-06014E; Bio-Optica) e eosina (HT1103128; Sigma-Aldrich) ou com Picrosirius Red (PSR). A avaliação histológica dos cortes corados com hematoxilina-eosina foi feita posteriormente com recurso ao microscópio ótico (Leica DM500). Já a avaliação das amostras coradas com PSR foi realizada com recurso a uma câmara (TIS 2MP RGB) acoplada a um microscópio vertical de campo amplo (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan), numa ampliação de 10x sob um feixe de luz polarizada. A observação sob um feixe de luz polarizada permite a observação das fibras de COL 1 coradas de vermelho e das fibras de COL 3 coradas de verde (Lunelli et al. 2013). De cada lâmina corada com PSR foram obtidas, aleatoriamente, 10 imagens das porções A, C e E em campo escuro (**Figura 4-II**) e, de forma a identificar as estruturas fotografadas, foram tiradas igualmente 10 fotografias em campo claro (**Figura 4-I**). Finalmente, foi realizada a avaliação qualitativa da presença de colagénio dos tipos I e III.

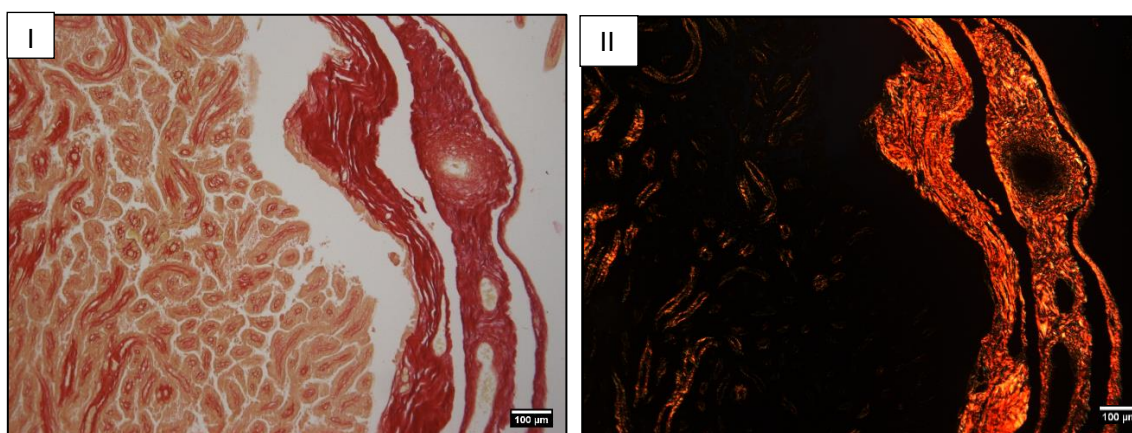


Figura 4. Corte histológico do corno grávido da placenta equina corado com Picrosirius Red.

Legenda: Visualização em campo claro (**I**) e em campo escuro, sob luz polarizada (**II**). O colagénio do tipo I está corado a vermelho e o colagénio do tipo III está corado a verde.

1.6 Medição da espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido da placenta equina

A espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido das amostras de placenta de égua foi avaliada. Para isso, foi utilizado o programa *Image J*. Selecionaram-se, aleatoriamente, duas fotografias do corno grávido de cada égua (novas e idosas) onde fosse

possível observar claramente a placa corial. De seguida, fizeram-se 10 medições para cada uma das fotografias. Depois de obtidas, as 20 medições foram sujeitas a análise estatística.

1.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa GraphPad Prism (versão 8.4.3) e ao programa Statistica 7. Os dados relativos à transcrição de mRNA do *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1* foram analisados pelo teste ANOVA a um fator, seguido do teste de Fisher (ou LSD) de comparações múltiplas. Os resultados obtidos da quantificação de hidroxiprolina foram analisados pelo teste ANOVA a um fator, seguido dos testes *post-hoc* de Fisher (ou LSD) e Tukey. Já os dados relativos à espessura da placa corial no corno grávido foram analisados pelo teste ANOVA a um fator, seguido dos testes de comparações múltiplas de Fisher (ou LSD) e Bonferroni. Por fim, os dados correspondentes ao peso do poldro às 24h, ao peso da placenta, à idade das éguas e à duração da gestação foram sujeitos a uma correlação de Pearson, seguida de regressão linear. O nível de significância foi definido para $p < 0,05$.

2. Resultados

As éguas utilizadas tinham idades entre os 5 e os 15 anos ($9,7 \pm 0,9$), tendo o número de partos variado entre 1 e 6 ($3,3 \pm 0,4$). As gestações que originaram as partições das quais se recolheram as placentas tiveram a duração mínima de 324 dias e a máxima de 352 dias ($337,2 \pm 2,3$). As placentas obtidas apresentaram pesos entre 3 e 7,5 Kg ($5,5 \text{ Kg} \pm 0,3$) e o peso dos poldros às 24h variou entre 35 Kg e 59,5 Kg ($50,8 \text{ Kg} \pm 1,8$). Ao considerarmos as éguas segundo a idade obtivemos os valores presentes na **Tabela 4**.

Tabela 4. Média (\pm erro padrão) da idade, número de partos, dias de gestação, peso da placenta (Kg) e peso do poldro (Kg) às 24h, consoante o grupo das éguas.

	Idade (anos)	Número de partos	Gestação (dias)	Peso da placenta (Kg)	Peso poldro (Kg) às 24h
Éguas novas	$6,4 \pm 0,6$	$1,71 \pm 0,36$	$333,4 \pm 3,38$	$4,5 \pm 0,32$	$45,6 \pm 2,84$
Éguas idosas	$12,2 \pm 0,5$	$4,44 \pm 0,34$	$340,1 \pm 2,81$	$6,2 \pm 0,25$	$54,8 \pm 1,15$

2.1 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Os resultados da análise de qRT-PCR, independentemente da idade da égua, revelaram não existirem diferenças estatísticas entre as duas porções (superior e inferior) do mesmo corno da placenta, em relação aos níveis de transcrição de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1*. Como tal, as porções A ou C são estatisticamente semelhantes às porções B ou D, respetivamente (dados não mostrados). Com base nestes resultados, as porções A, C e E da placenta foram as únicas utilizadas na determinação da hidroxiprolina, assim como, para análise qualitativa da área ocupada pelo COL1 ou pelo COL3, nos cortes histológicos corados por PSR e observados ao microscópio ótico com luz polarizada.

2.1.1 Níveis de transcritos de mRNA de *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1*

Em éguas com 10 ou mais anos, o nível de transcritos de mRNA de *COL1A1* no corno grávido (A) foi mais elevado quando comparado com a mesma porção ($p=0,01$), com o corno não-grávido (C) e com o corpo da placenta (E) de éguas mais novas, com idades entre os 5 e os 9 anos ($p<0,05$). Além disso, a transcrição de *COL1A1* no corno-grávido de éguas mais velhas estava também aumentada, em contraste com o corno não-grávido e corpo da mesma placenta ($p<0,05$; **Figura 5**).

No entanto, não foram encontradas diferenças nos níveis de mRNA de *COL1A2*, entre placentas de éguas novas e idosas, para nenhuma das porções avaliadas.

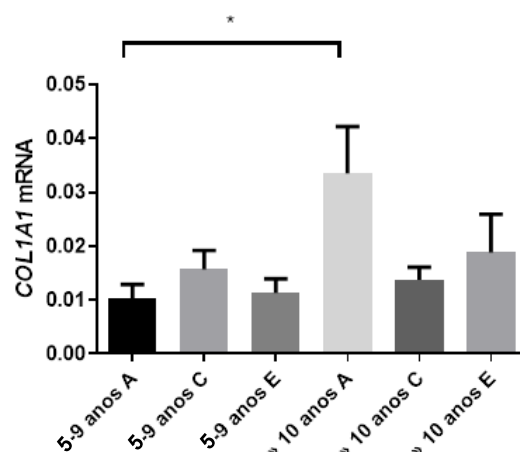


Figura 5. Níveis de transcrição de *COL1A1* no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.

Legenda: As barras representam a média \pm erro padrão. O asterisco indica diferenças significativas entre as porções da placenta (* $p < 0.05$).

Relativamente aos níveis de mRNA de *COL3A1*, de forma semelhante ao *COL1A1*, houve um aumento no corno grávido da placenta de éguas idosas quando comparados com a mesma porção, assim como com porções não-grávidas (C e E) de placentas de éguas novas ($p < 0.05$). O corno grávido de placentas de éguas com 10 ou mais anos, apresentou o nível de transcrito mais elevado, comparativamente, às porções C e E da mesma placenta ($p < 0.05$; **Figura 6**).

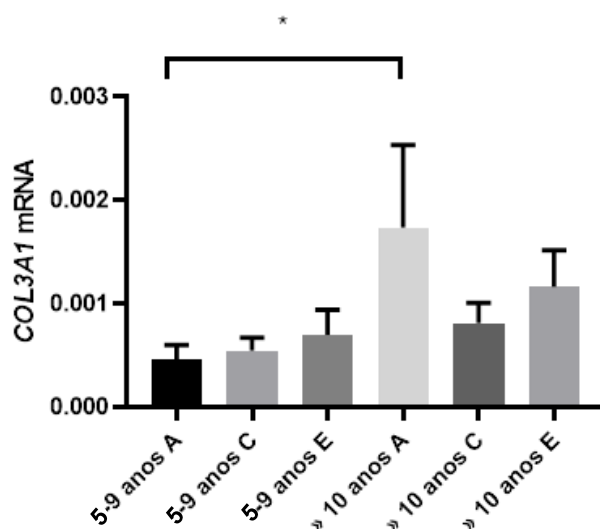


Figura 6. Níveis de transcrição de *COL3A1* no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.

Legenda: As barras representam média \pm erro padrão. O asterisco indica diferenças significativas entre as porções da placenta (* $p < 0.05$).

Além disso, quando os níveis de transcritos de *COL5A1* foram avaliados nas diferentes porções da placenta, notou-se um aumento dos níveis de mRNA no corno grávido

de éguas idosas, em comparação com qualquer porção da placenta de éguas mais novas, tais como, o corno grávido, não-grávido e o corpo da placenta ($p<0,05$; **Figura 7**).

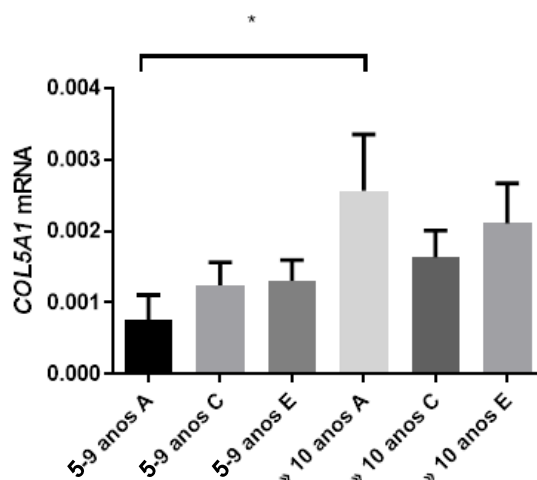


Figura 7. Níveis de transcrição de *COL5A1* no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.

Legenda: As barras representam média ± erro padrão. O asterisco indica diferenças significativas entre as porções da placenta (* $p<0.05$).

2.2 Determinação da concentração de hidroxiprolina

Como nem sempre a transcrição de mRNA dos genes de colagénio (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* e *COL5A1*) corresponde à quantidade de proteína, houve a necessidade de determinar a quantidade total de hidroxiprolina.

De forma semelhante ao aumento de transcritos de *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1* obtidos por qRT-PCR, houve um aumento do aminoácido hidroxiprolina no corno grávido de éguas idosas (≥ 10 anos), relativamente, a éguas mais novas (entre os 5 e os 9 anos) (**Figura 8**).

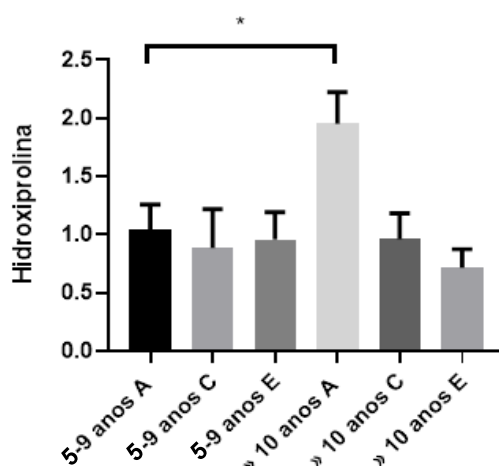


Figura 8. Níveis de hidroxiprolina no corno grávido (A), não-grávido (C) e corpo (E) de placentas de éguas novas e idosas.

Legenda: As barras representam média ± erro padrão. O asterisco indica diferenças significativas entre as porções da placenta (* $p<0.05$).

2.3 Avaliação histológica qualitativa de COL1 e COL3 na placenta da égua

Foi criada uma tabela com as diferentes estruturas histológicas da corioalantóide equina. De seguida, foi atribuída a cada porção (A, C e E) da placenta de cada uma das éguas uma avaliação qualitativa da quantidade e do tipo de fibras de colagénio presentes nessas estruturas, nomeadamente, no tecido conjuntivo da membrana corioalantóideia (tecido conjuntivo alantoideu- internamente e placa corial- externamente) e no eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas (dados não mostrados).

Observámos que, no tecido conjuntivo da placa corial do corno grávido da placenta de todas as éguas parece haver uma maior abundância de fibras de COL 1 (**Figura 9-IIA**). Quanto ao tecido conjuntivo alantoideu, parecem predominar as fibras de COL 3 (**Figura 9-IIB**), igualmente em grande quantidade.

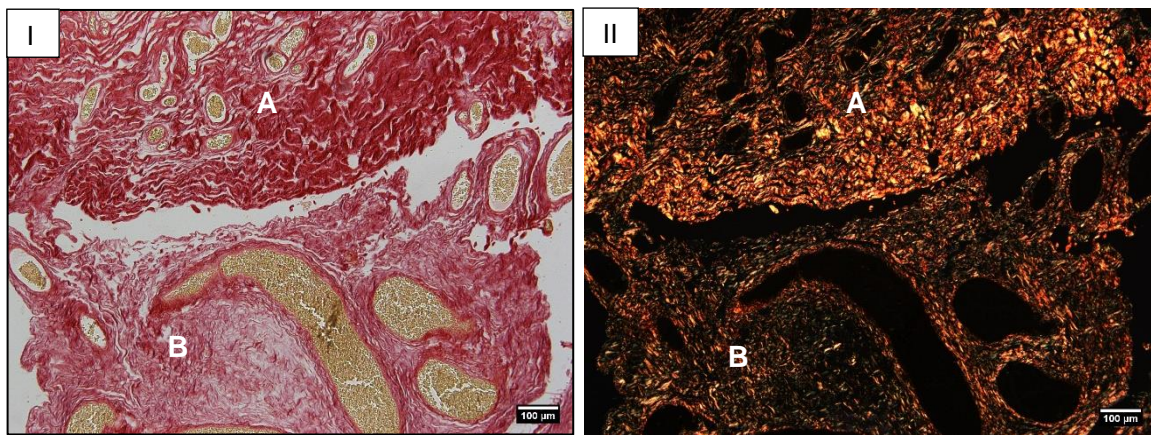


Figura 9. Corte histológico do corno grávido da placenta equina corado com Picrosirius Red.

Legenda: Visualização em campo claro (I) e sob luz polarizada (II). O colagénio do tipo I está corado a vermelho e o colagénio do tipo III a verde. Tecido conjuntivo da placa corial (A) e tecido conjuntivo da membrana alantoideia (B).

No entanto, a distribuição das fibras de colagénio no tecido conjuntivo da placa corial não é uniforme. Ou seja, parece haver mais fibras de COL 3 na transição do tecido conjuntivo da placa corial para o eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas (externamente) (**Figura 10-IIA**) e mais fibras de COL 1 na transição do tecido conjuntivo da placa corial para o tecido conjuntivo alantoideu (internamente) (**Figura 10-IIB**). Esta diferença na distribuição das fibras de colagénio está presente em todas as porções das placentas avaliadas (A, C e E). No entanto, é muito evidente no corno grávido e no corpo da placenta, mas subtil no corno não-grávido.

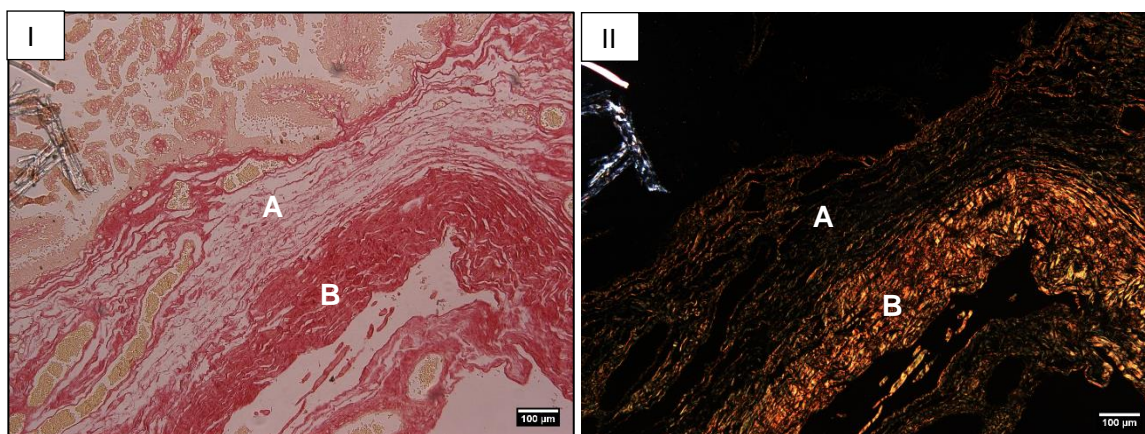


Figura 10. Corte histológico do corno grávido da placenta equina corado com Picrosirius Red.

Legenda: Visualização em campo claro (I) e sob luz polarizada (II). O colagénio do tipo I está corado a vermelho e o colagénio do tipo III a verde. Porções externa (A) e interna (B) do tecido conjuntivo da placa corial. Distribuição de COL 3 externamente (II-A) e de COL 1 internamente (II-B).

Quando o espaço exocelômico está presente, observa-se uma distribuição diferente do tipo de fibras de colagénio nas suas margens. Isto é, na fina camada de tecido conjuntivo aderente ao epitélio de superfície alantoideu (mais internamente) há predominância de fibras de COL 1 (**Figura 11-IIA**). Já na porção de tecido conjuntivo alantoideu associada à placa corial (externamente), predominam as fibras do tipo 3 (**Figura 11-IIB**).

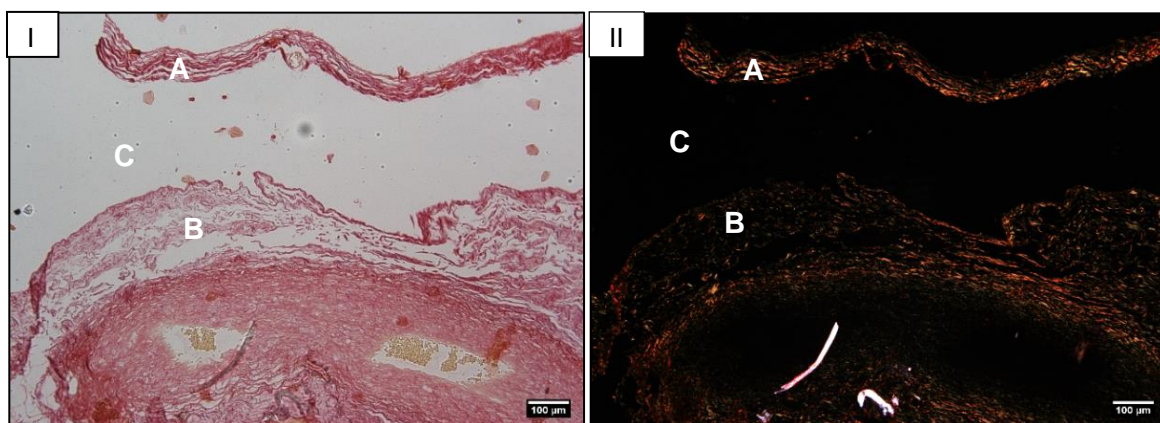


Figura 11. Corte histológico do corpo da placenta equina corado com Picrosirius Red.

Legenda: Visualização em campo claro (I) e sob luz polarizada (II). O colagénio do tipo I está corado a vermelho e o colagénio do tipo III a verde. Distribuição de COL 1 no tecido conjuntivo aderente ao epitélio alantoideu (II-A) e de COL 3 no tecido conjuntivo alantoideu associado à placa corial (II-B). Espaço exocelômico (C).

No eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas, houve muito pouca quantidade de fibras do tipo I ou do tipo III, nas três porções da placenta. No entanto, tanto predomina o COL1, como o COL3. Há variação do predomínio de COL1 ou COL3 consoante a égua, mas independente da idade (**Figura 12**).

Por outro lado, parece haver mais quantidade de fibras de colagénio nas vilosidades coriônicas do corno grávido, quando comparadas com o corno não-grávido e corpo da placenta.

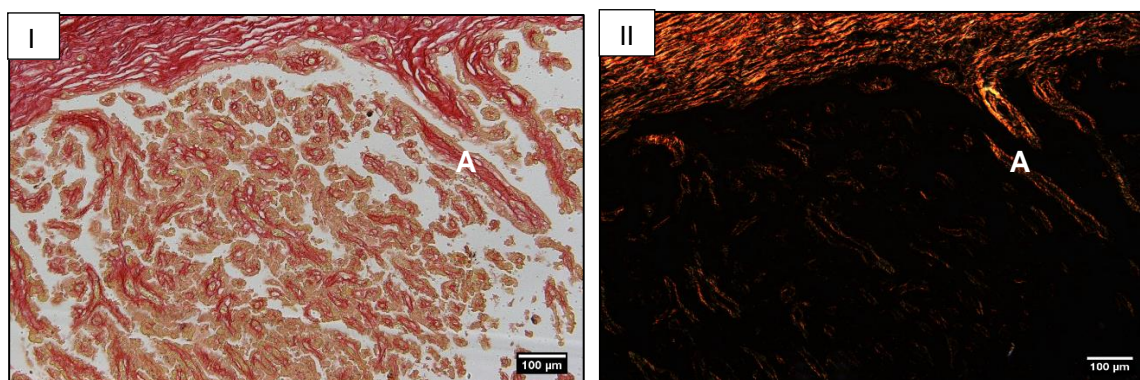


Figura 12. Corte histológico do corpo da placenta equina corado com Picrosirius Red.

Legenda: Visualização em campo claro (I) e sob luz polarizada (II). O colagénio do tipo I está corado a vermelho e o colagénio do tipo III a verde. Eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas (A). Neste caso, houve predomínio de COL1.

Estas observações referentes à distribuição do COL1 e COL3 no tecido conjuntivo da placa corial, no tecido conjuntivo alantoideu e no eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas, identificadas pelas **Figuras 9, 10, 11, e 12** estão presentes em todas as éguas, independentemente da idade. Seguidamente, segue-se a descrição dos achados histológicos referentes aos dois grupos de animais: éguas novas e éguas idosas.

a) Éguas novas

Nas éguas **19.18, 19.22, 19.29 e 19.33** (9, 5, 5 e 6 anos, respetivamente), não foi muito marcada a diferença na quantidade de fibras de colagénio entre o corno grávido e o corno não-grávido ou o corpo da placenta. Quanto ao eixo conjuntivo das vilosidades coriônicas, parece predominar o COL 1, tendo em conta as três porções.

Na égua **19.19** (5 anos), de forma idêntica ao verificado no caso anterior, não foi muito evidente a diferença na quantidade de fibras de colagénio entre o corno grávido e o corno não-grávido ou o corpo da placenta. Contudo, nas amostras de corioalantóide desta égua parece ser muito evidente a presença de fibras de COL 1 no corno grávido. Já nas porções C e E, a distribuição das fibras de colagénio variou consoante a parte da corioalantóide, ou seja, a nível do tecido conjuntivo alantoideu houve mais COL 3 e no tecido conjuntivo da placa corial mais COL 1, enquanto que, no eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas predominou o COL 3.

A égua **19.26** (6 anos) foi a égua com a avaliação histológica da placenta mais distinta das restantes, devido à menor quantidade de fibras de colagénio no corno grávido, ao domínio evidente de COL 3 por toda esta porção e à diferente distribuição das fibras de colagénio no tecido conjuntivo da placa corial. Contrariamente ao verificado nas outras placentas estudadas, a faixa de tecido conjuntivo adjacente às vilosidades (externamente) é muito larga e a faixa de tecido conjuntivo associada à membrana alantoideia (internamente) é mais fina. Sendo que, devido a esta diferença do tecido conjuntivo da placa corial, é visível o predomínio das fibras de COL 3, contrariamente ao que se tem observado (predomínio de COL 1 no tecido conjuntivo da placa corial). No eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas observou-se pouca quantidade de fibras de colagénio, com predomínio de COL 3. No corno não-grávido mantém-se a presença de algumas fibras de colagénio no tecido conjuntivo da placa corial. Além disso, assim como no corno grávido, há domínio das fibras de COL 3. No eixo do tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas das três porções, é de referir a presença de muito poucas fibras de colagénio, onde, ainda assim, predomina o COL 3. Sintetizando, nesta placenta é evidente a menor quantidade de fibras de colagénio e um predomínio de COL 3 em todas as estruturas das três porções.

Nas amostras de placenta da égua **19.27** (9 anos), relativamente ao tecido conjuntivo alantoideu do corno grávido e do corno não-grávido, é de realçar a presença de grande quantidade de fibras de COL 1, contrariamente ao que se tem observado nas avaliações histológicas das restantes éguas (predomínio de COL 3). Parece também ser evidente uma diminuição da quantidade de fibras de colagénio no corpo da placenta, quando comparada com o corno grávido e não-grávido. No eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas das três porções são visíveis poucas fibras de colagénio, em que a distribuição de COL 1 é semelhante à de COL 3.

b) Éguas idosas

Nas éguas **19.16, 19.20 e 19.25** (14, 11 e 12 anos, respetivamente), observa-se maior quantidade de fibras de colagénio no corno grávido do que no corno não-grávido e corpo da placenta. Quanto ao eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas, há um predomínio de COL 3 nas três porções.

Nas éguas **19.17, 19.31, 19.32 e 19.21** (10, 11, 12 e 15 anos, respetivamente), contrariamente ao verificado no caso anterior, não é tão nítida a diferença na quantidade de fibras de colagénio entre o corno grávido e o corno não-grávido ou o corpo da placenta. Quanto ao eixo conjuntivo das vilosidades coriônicas, pareceu haver uma distribuição semelhante entre o COL 1 e o COL 3, tendo em conta as três porções da placenta.

Na égua **19.28** (14 anos), ao contrário do que foi observado até agora, observou-se pouca quantidade de colagénio no corno grávido. E, de uma forma geral, tendo em conta as três porções, a corioalantóide desta égua aparenta ter menor quantidade de fibras de colagénio do que as éguas anteriores. Já a distribuição das fibras de colagénio pelas diferentes estruturas da corioalantóide é idêntica.

Na avaliação histológica da placenta da égua **19.30** (11 anos), a única diferença para as restantes éguas é o facto de que, no eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas, houve muito pouca quantidade de fibras de colagénio. De facto, quase não estão presentes. Também parece haver um predomínio do COL 1 no tecido conjuntivo alantoideu, onde em outras éguas idosas predomina o COL 3.

2.4 Medição da espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido da placenta equina

Na avaliação histológica qualitativa de COL1 e de COL3 nas placentas equinas não foram observadas diferenças evidentes que explicassem o aumento dos níveis de transcritos de mRNA de *COL1A1* e de *COL3A1*, evidenciado pelo qRT-PCR e pela quantificação do aminoácido hidroxiprolina. Como foi observada alguma aparente variação na dimensão da placa corial do corno grávido entre as amostras, houve a necessidade de medir a espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido de todas as amostras das placentas de éguas novas e idosas.

Os resultados indicam que houve um aumento significativo da espessura (μm) do tecido conjuntivo da placa corial do corno grávido de éguas idosas, quando comparada com a mesma estrutura de éguas novas ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

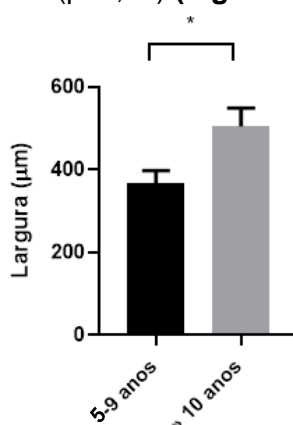


Figura 13. Espessura do tecido conjuntivo da placa corial do corno grávido de éguas novas e de éguas idosas.

Legenda: As barras representam média \pm erro padrão. O asterisco indica diferenças significativas entre as porções da placenta (* $p < 0,05$).

2.5 Correlações entre variáveis

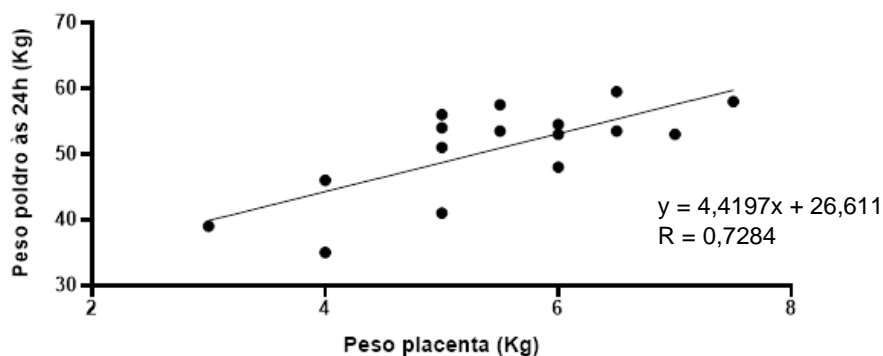


Figura 14. Correlação de Pearson e regressão linear entre o peso da placenta (Kg) e o peso do poldro às 24h (Kg) ($p=0,001$).

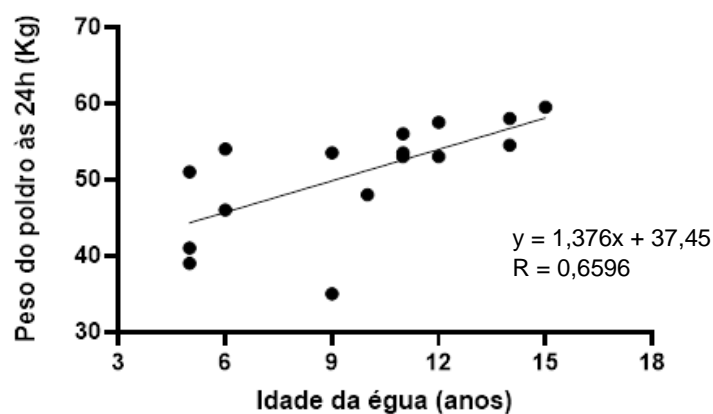


Figura 15. Correlação de Pearson e regressão linear entre a idade da égua (anos) e o peso do poldro às 24h (Kg) ($p=0,005$).

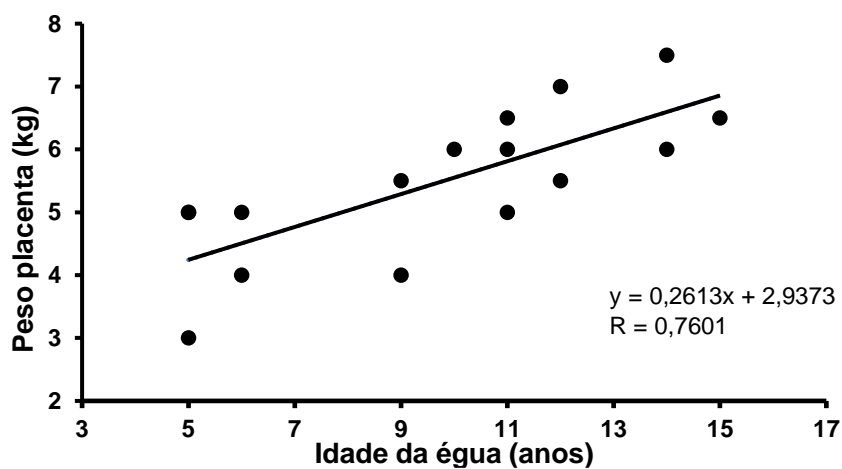


Figura 16. Correlação de Pearson e regressão linear entre a idade da égua (anos) e o peso da placenta (Kg) ($p=0,005$).

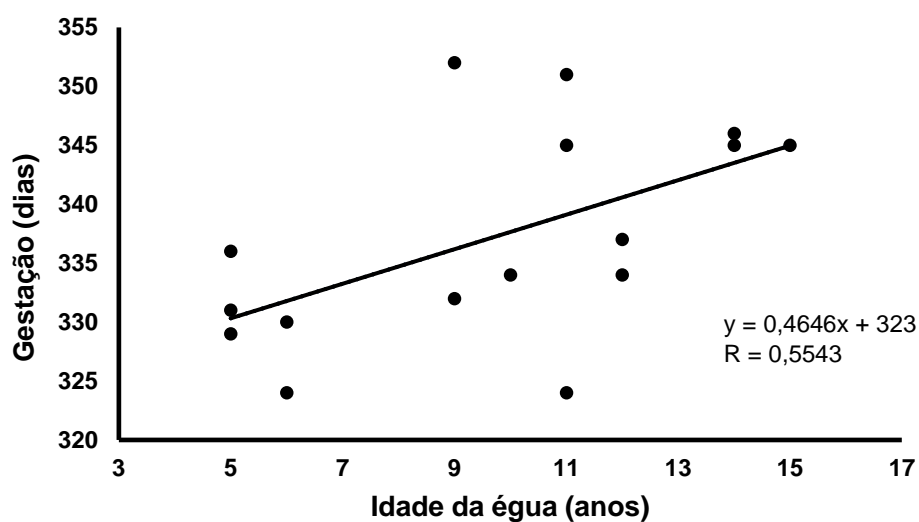


Figura 17. Correlação de Pearson e regressão linear entre a idade da égua (anos) e a duração da gestação (dias) ($p=0,005$).

Houve uma forte correlação positiva entre o peso da placenta (Kg) e o peso do poldro às 24h (Kg) (**Figura 14**), entre a idade da égua e o peso do poldro às 24h (**Figura 15**) e entre a idade da égua e o peso da placenta (**Figura 16**). Verificou-se também uma moderada correlação positiva entre a idade da égua e a duração da gestação (dias) (**Figura 17**).

Parte IV- Discussão

Os níveis de transcritos de mRNA, obtidos através de qRT-PCR, mostraram que há um aumento de *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1* no corno grávido de éguas com 10 ou mais anos de idade. Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo que quantifica a presença de colagénio na placenta equina. Contudo, há estudos desenvolvidos em placentas humanas. Está documentado que ligeiras alterações nos diferentes componentes da MEC podem resultar em alterações das propriedades da mesma (Amenta et al. 1986) e, possivelmente, da função placentária. De forma idêntica, Hirayama (1983) defende que o colagénio presente na placenta humana não está apenas associado ao desenvolvimento normal da placenta, mas também está associado a complicações metabólicas da função placentária. De facto, os colagénios dos tipos I, III, IV e V estão ativamente envolvidos na formação do processo fibrótico das vilosidades coriônicas da placenta humana (Rukosuev et al. 1990). Além disso, as alterações na composição do colagénio, durante o desenvolvimento e envelhecimento da placenta humana com o avançar da gestação, podem ter um papel importante no fornecimento de nutrientes ao feto e na manutenção da gestação (Iwahashi et al. 1996). Num estudo desenvolvido em placentas equinas, observou-se que alterações histológicas da placenta estavam associadas a morte ou anomalias fetais. De facto, a presença de lesões histopatológicas na placenta parece estar mais associada a anomalias no poldro do que à percentagem da área da placenta envolvida no processo anormal (Cottrill et al. 1991).

Os resultados obtidos através da quantificação de hidroxiprolina coincidiram com os níveis de transcritos de mRNA de *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1*, indicando um aumento do colagénio total no corno grávido de éguas idosas (≥ 10 anos). De facto, a regulação pós-transcricional, pós-traducional e de degradação contribui para a concentração de proteínas no tecido (Vogel and Marcotte 2012).

Nos tecidos em geral, as fibras de colagénio do tipo I distribuem-se de forma diferente das fibras de colagénio do tipo III. As fibras de colagénio tipo I encontram-se densamente agrupadas em feixes, exercendo um papel estrutural e promovendo a ligação entre estruturas. Já as fibras reticulares, formadas predominantemente por colagénio tipo III, distribuem-se finamente sob a forma de uma rede, desempenhando um papel de suporte (Junqueira and Carneiro 2013). Através de métodos de imunofluorescência e microscopia imuno-eletrónica, confirmou-se a localização de colagénio do tipo III no estroma das vilosidades coriônicas da placenta humana (Nanaev et al. 1989). No presente estudo, este facto também foi observado no eixo de tecido conjuntivo das vilosidades coriônicas, presente nos cortes histológicos de placenta equina corados com PSR e observados ao microscópio ótico sob um feixe de luz polarizada.

Sabemos que o colagénio do tipo I é a unidade básica estrutural da placenta humana de termo (Amenta et al. 1986). E, na avaliação dos cortes histológicos corados por PSR, foi possível observar que as fibras de colagénio dos tipos I e III têm diferente localização consoante a estrutura histológica da corioalantóide equina. De facto, na placenta da égua, parece haver predomínio de COL1 na placa corial e de COL3 na membrana alantoideia, independentemente da idade. Contudo, nas vilosidades coriônicas os dois tipos de colagénio estão presentes em quantidade semelhante. Um estudo recente, sugere que as éguas com retenção placentária apresentam maior quantidade de tecido conjuntivo nas vilosidades coriônicas devido à desregulação da expressão e ativação de MMPs (Rapacz-Leonard et al. 2015).

O aumento da espessura correspondente ao tecido conjuntivo da placa corial, observado no corno grávido da placenta de éguas idosas, pode explicar o aumento dos níveis de transcritos de mRNA de *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1* e o aumento de hidroxiprolina. Contudo, mais estudos são necessários para suportar esta hipótese. Nos mamíferos, o principal determinante do crescimento intra-uterino é o fornecimento de nutrientes pela placenta, que, por sua vez, depende do tamanho, da morfologia, do fornecimento sanguíneo e da capacidade de transporte da placenta, assim como, da síntese e metabolismo de nutrientes e hormonas pelos tecidos uteroplacentários (Fowden et al. 2006). Em humanos, quaisquer alterações na área de superfície, na vascularização, na composição celular ou na espessura da barreira da placenta, influenciam a sua capacidade de transporte (Sibley et al. 1997). Sabemos que a fibrose pode afetar a função de um órgão por perturbação do transporte de fluidos e de eletrólitos (Jellis et al. 2010) e, apesar dos resultados obtidos neste estudo não corroborarem esta hipótese, é possível que o grau de fibrose da placenta de éguas idosas influencie o peso do poldro ao nascimento.

Vários autores documentaram o aparecimento de alterações degenerativas no endométrio equino com o avançar da idade (Ricketts and Alonso 1991; Carnevale and Ginther 1992; Kenney 1992), que levam a menor desenvolvimento dos microcotilédones placentários (Bracher et al. 1996). Um trabalho realizado no nosso laboratório, mostrou o aparecimento de fibrose no oviduto associada a endometrose em éguas idosas (Pinto-Bravo et al. 2018). Como tal, surge a hipótese de acontecer o mesmo na estrutura histológica da placenta equina. Considerando o presente estudo, parece haver, com o aumento da idade, deposição de fibras de colagénio em quantidade significativa na placa corial, membrana alantoideia e vilosidades coriônicas da corioalantóide, e isso poderá ter consequências no desenvolvimento intra-uterino e no peso do poldro à nascença. De facto, o peso do poldro à nascença é um reflexo do equilíbrio entre o contacto fetomaternal e a eficiência placentária. Quaisquer deficiências na função placentária podem refletir-se em défices correspondentes do desenvolvimento e maturação fetal (Wilsher and Allen 2003).

O peso à nascença pode influenciar a futura *performance* atlética. Em 1978, Platt forneceu dados importantes relativos a poldros que nasceram com peso ou tamanho visualmente inferior ao normal. Neste estudo, houve uma redução no peso ao nascimento em 43 poldros, sendo que, apenas 36 destes poldros sobreviveram até à idade desportiva. Contudo, a proporção de poldros que realmente competiu foi mais baixa do que a de um grupo de controlo com 997 poldros que apresentaram peso normal à nascença. Pode ocorrer alguma compensação no desenvolvimento pós-natal (Allen et al. 2004). No entanto, a suscetibilidade em cavalos adultos a doenças endócrinas ou vasculares pode estar relacionada com as condições ambientais que os mesmos experienciaram no início da vida (Fowden et al. 2019). De forma idêntica, Barker (2006) demonstrou que, em humanos, existe uma forte associação entre um baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta.

Em éguas Puro Sangue Inglês, a idade e a paridade são determinantes na área de contacto entre a corioalantóide e o endométrio e na capacidade placentária. Estas variáveis influenciam também a densidade superficial de microcotilédones e, consequentemente, a área total de contacto entre o feto e a mãe. É de facto notório que, as éguas primíparas têm, normalmente, placentas e poldros mais leves do que as éguas múltíparas. É como se o útero precisasse de ser “testado” uma primeira vez antes de atingir o seu máximo potencial em termos de promoção de desenvolvimento placentário e fetal (Wilsher and Allen 2003). Isto acontece, provavelmente, devido à reduzida capacidade de alongamento do útero na primeira gestação, que leva a que haja um reduzido espaço intra-uterino para o feto em crescimento (Bhuvanakumar and Satchidanandam 1989). Este estudo mostra que a área total da placenta de éguas Puro Sangue Inglês aumenta significativamente entre a primeira e a segunda gestações.

Elliott e colaboradores (2009) descreveram uma correlação positiva entre o peso total das membranas fetais e o peso do poldro ao nascimento, para equinos da raça Puro Sangue Inglês. Os mesmos autores observaram que para cada Kg de aumento no peso placentário ocorreu um aumento de 4,5 Kg no peso do poldro. De forma idêntica, relações lineares positivas foram reportadas em cavalos do Reino Unido e do Brasil (Wilsher and Allen 2002; Serrano-Recalde et al. 2017). O peso da placenta aumenta progressivamente com o número de gestações, sendo que, o tamanho deste órgão afeta diretamente a função placentária pela alteração na área superficial de transporte (Fowden et al. 2006).

De uma forma geral, a eficiência placentária aumenta com a paridade durante a vida reprodutiva das éguas (Wilsher and Allen 2003). Por outro lado, os mesmos autores identificaram que éguas nulíparas e múltíparas com idade avançada, apresentaram um menor peso e volume da placenta, menor área microscópica e uma redução na área de superfície e de contacto dos microcotilédones. De forma idêntica, Bracher e colaboradores

(1996) explicam que a eficiência placentária diminui com o avanço da idade em éguas subférteis com alterações degenerativas do endométrio, devido à menor área de troca placentária. De facto, em éguas idosas com endometrose, as vilosidades coriônicas fetais são mais curtas e irregulares quando comparadas com éguas jovens saudáveis com a mesma idade gestacional (Abd-Elnaeim et al. 2006). Infelizmente, éguas com lesões endometriais muito acentuadas não são capazes de suportar o normal desenvolvimento dos microcotilédones placentários e, frequentemente, abortam durante o primeiro trimestre devido a insuficiência placentária (Schlafer 2004). Além disso, as lesões histológicas características de insuficiência placentária são enfarte placentário, hipertrofia do citotrofoblasto, deficiência das membranas endoteliais, necrose fibrinóide das vilosidades, espessamento das membranas basais, edema do estroma, hipovascularidade placentária e fibrose do estroma (Fox 1978).

Como em grande parte dos estudos nas áreas das ciências biológicas e biomédicas, há limitações, principalmente de natureza técnica e metodológica. No nosso estudo, a amostra de placentas foi pequena (n= 16) e, como tal, tivemos de considerar “éguas novas” aquelas com idades entre os 5 e os 9 anos, de forma a termos dois grupos representativos (7 éguas novas e 9 éguas idosas). Além disso, a amostra de “éguas idosas” incluiu éguas a partir dos 10 anos, tendo a mais velha apenas 15 anos. Não houve, de facto, uma diferença notória de idades entre a égua mais velha do grupo “éguas novas”, com 9 anos, e a égua mais nova do grupo de “éguas idosas”, com 10 anos de idade. Para além disso, o facto de o presente estudo só incidir em placentas que foram obtidas de partições com sucesso, sugere que os casos de lesões histológicas de placentas disfuncionais, que possivelmente originaram abortos, não tenham sido considerados. Isto poderá explicar não ser evidente qualquer repercussão negativa do envelhecimento da égua no peso do poldro. Por fim, infelizmente, não foi possível recolher as biópsias de endométrio das éguas às quais foram recolhidas as placentas, impossibilitando uma eventual correlação entre o grau de endometrose e a fibrose presente na placenta. No entanto, estes dados podem ser importantes para a reprodução equina. Por isso, tendo como ponto de partida este projeto, a investigação deve ser continuada incluindo uma maior amostragem de placentas equinas (incluindo partições com sucesso e abortos), com que seja possível obter grupos de éguas jovens, e outro de éguas mais velhas, com idades bastante distanciadas entre si. Será também de extrema importância a obtenção das biópsias endometriais correspondentes, de forma a compreender se a fibrose no endométrio é acompanhada de fibrose na placenta e a sua fisiopatologia.

Parte V- Conclusões

A placenta equina é um órgão muito complexo que atua em sincronia perfeita com o desenvolvimento do feto e as suas necessidades, assim como, com a égua e a sua capacidade de suportar a gestação.

Através da avaliação quantitativa, realizada nas amostras de placenta pelo qRT-PCR e complementada pela quantificação do aminoácido hidroxiprolina, concluímos que houve um aumento da transcrição de mRNA de *COL1A1*, *COL3A1* e *COL5A1* e do colagénio total no corno grávido de éguas com 10 ou mais anos de idade.

Através da avaliação qualitativa realizada nas amostras de placenta coradas por PSR, com recurso ao microscópio ótico sob um feixe de luz polarizada, concluímos que a distribuição das fibras de COL 1 e de COL 3 varia consoante a estrutura histológica da placenta. Também foi possível concluir que houve uma maior quantidade de fibras de colagénio, tanto de COL 1 como de COL 3, no corno grávido, quando comparadas com o corno não-grávido e o corpo da placenta. Além disso, a espessura do tecido conjuntivo da placa corial no corno grávido de éguas mais velhas é maior do que na mesma estrutura de éguas novas, o que pode explicar o aumento dos níveis de transcritos de mRNA do *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* e do colagénio total.

Como reportado em estudos anteriores, houve uma correlação positiva entre o peso do poldro e o peso da placenta, assim como, entre o peso do poldro e a idade da égua. Apesar de não ter sido encontrada uma correlação entre o colagénio total presente na placenta e a idade da égua nem com o peso do poldro, a fibrose, a qual é caracterizada pelo aumento da deposição de fibras de colagénio, estava aumentada no corno grávido de placentas de éguas idosas. Noutras espécies, a fibrose do estroma é um sinal característico de insuficiência placentária que pode, eventualmente, refletir-se na viabilidade e no peso do recém-nascido.

Parte VI- Referências bibliográficas

Abd-Elnaeim MMM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR. 2006. Structural and Haemovascular Aspects of Placental Growth Throughout Gestation in Young and Aged Mares. *Placenta*. 27(11–12):1103–1113. doi:10.1016/j.placenta.2005.11.005.

Aceves SS, Ackerman SJ. 2009. Relationships Between Eosinophilic Inflammation, Tissue Remodeling, and Fibrosis in Eosinophilic Esophagitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 29(1):197–211. doi:10.1016/j.iac.2008.10.003.

Allen WR (Twink). 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*. 121(4):513–527.

Allen WR, Brown L, Wright M, Wilsher S. 2007. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet J*. 39(5):438–445. doi:10.2746/042516407X1737581.

Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN. 2006. Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. *Anim Reprod Sci*. 94(1–4):242–243. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.04.035.

Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III postnatal growth. *Reproduction*. 127(1):67–77. doi:10.1530/rep.1.00024.

Amaral A, Fernandes C, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Baclawska A, Rebordão MR, Aguiar-Silva J, Pinto-Bravo P, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2018. Elastase inhibition affects collagen transcription and prostaglandin secretion in mare endometrium during the estrous cycle. *Reprod Domest Anim*. 53(May):66–69. doi:10.1111/rda.13258. <http://doi.wiley.com/10.1111/rda.13258>.

Amaral A, Fernandes C, Rebordão MR, Szóstek-Mioduchowska A, Lukasik K, Gawronska-Kozak B, Telo da Gama L, Skarzynski DJ, Ferreira-dias G. 2020. The In Vitro Inhibitory Effect of Sivelestat on Elastase Induced Collagen and Metalloproteinase Expression in Equine Endometrium. *Animals*. 10(863):1–16.

Amenta PS, Gay S, Vaheri A, Martinez-Hernandez A. 1986. The Extracellular Matrix is an Integrated Unit: Ultrastructural Localization of Collagen Types I, III, IV, V, VI, Fibronectin, and Laminin in Human Term Placenta. *Top Catal*. 6(2):125–152. doi:10.1016/S0174-173X(86)80021-8.

Bacha WJ, Bacha LM. 2012. *Color Atlas of Veterinary Histology*. Second. Balado D, Battaglia D, Smith A, Weir JD, editors.

Bailey JR, Bland PW, Tarlton JF, Peters I, Moorghen M, Sylvester PA, Probert CSJ, Whiting C V. 2012. IL-13 Promotes Collagen Accumulation in Crohn's Disease Fibrosis by Down-Regulation of Fibroblast MMP Synthesis: A Role for Innate Lymphoid Cells? *PLoS One*. 7(12):1–13. doi:10.1371/journal.pone.0052332.

Barker DJP. 2006. Chronic disease in humans originates in the intra-uterine environment. *Anim Reprod Sci*. 94(1–4):343–354. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.05.005.

Bhuvanakumar CK, Satchidanandam V. 1989. Effect of parity on the birthweight of foals in Thoroughbreds. *Centaur* 6: 43-45.

Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B. 2016. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: Answered and unanswered questions. *F1000Research*. 5(0):1–8. doi:10.12688/f1000research.8190.1.

Bracher V, Mathias S, Allen WR. 1996. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Vet J*. 28(3):180–188. doi:10.1111/j.2042-3306.1996.tb03771.x.

Brandt GW, Manning JP. 1969. Improved uterine biopsy technics for diagnosing infertility in the mare. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician*. 64(11):977–983.

Bratton DL, Henson PM. 2011. Neutrophil clearance: When the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*. 32(8):350–357. doi:10.1016/j.it.2011.04.009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>.

Bronnum H, Eskildsen T, Andersen DC, Schneider M, Sheikh SP. 2013. IL-1 β suppresses TGF- β -mediated myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Growth Factors*. 31(3):81–89.

Buczkowska J, Kozdrowski R, Nowak M, Sikora M. 2016. Relationship between uterine biopsy score, endometrial infection and inflammation in the mare. *Tierarztl Prax Ausgabe G Grosstiere - Nutztiere*. 44(3):158–163. doi:10.15653/TPG-150581.

Caixeta ES, Fagundes NS, Caixeta MS, Pyles ESS. 2008. Desenvolvimento embrionário inicial eqüino – revisão. *Rev Port Ciências Veterinárias*. 103(565–566):25–34.

Carnevale EM. 2008. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*. 69(1):23–30. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.011.

Carnevale EM, Ginther OJ. 1992. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*. 37(5):1101–1115.

Chambers RC. 2008. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: Novel opportunities for pharmacological intervention? *Br J Pharmacol*. 153(SUPPL. 1):367–378. doi:10.1038/sj.bjp.0707603.

Chambers RC, Laurent GJ, Westergren-Thorsson G. 1998. Cadmium inhibits proteoglycan and procollagen production by cultured human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19(3):498–506. doi:10.1165/ajrcmb.19.3.3242.

Chavatte P, Holtan D, Ousey JC, Rossdale PD. 1997. Biosynthesis and possible biological roles of progestagens during equine pregnancy and in the newborn foal. *Equine Vet J*. 24:89–95. doi:10.1111/j.2042-3306.1997.tb05084.x.

Chenier T. 2011. The importance of thorough evaluation of the fetal membranes of the mare. *Equine Vet Educ*. 23(3):119–120. doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00189.x.

Costa LD da. 2015. Caracterização histoquímica e imuno-histoquímica das alterações fibróticas nas endometroses das éguas. [dissertação de mestrado]. Botucatu- SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”

Cottrill C, Jeffers-Lo J, Ousey J, McGladdery A, Ricketts S, Silver M, Rossdale P. 1991. The placenta as a determinant of fetal wellbeing in normal and abnormal equine pregnancies. *Journal of Reproduction and Fertility*. (44):591–60.

Davies Morel MCG, Newcombe JR, Swindlehurst JC. 2005. The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. *Theriogenology*. 63(9):2482–2493. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.058.

Desmoulière A. 1995. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int*. 19(5):471–476. doi:10.1006/cbir.1995.1090.

Ebert A, Schoon D, Schoon HA. 2014. Age-related endometrial alterations in mares- biopsy findings of the last 20 years. In: Rackwitz R, Pees M, Aschenbach JR, Gäbel G, editors. *Leipziger Blaue Hefte, 7th Leipzig Veterinary Congress, 8th International Conference on Equine Reproductive Medicine*. Lehmanns Media GmbH: Berlin, Germany; 2:230–232.

Edward SC, Greenle BM, Wills-Karp M, Moller DR. 2001. Attenuation of Lung Inflammation and Fibrosis in Interferon- γ –Deficient Mice after Intratracheal Bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 24:545–555. doi:10.1186/1465-9921-12-131.

Elliott C, Morton J, Chopin J. 2009. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology*. 71(4):683–689. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.041.

Enders AC, Blankenship TN. 1999. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 38(1):3–15. doi:10.1016/S0169-409X(99)00003-4.

Enders AC, Liu IKM. 1991. Trophoblast- Uterine Interactions During Equine Chorionic Girdle Cell Maturation, Migration, and Transformation. *Am J Anat*. 192:366–381.

Esteller-vico A, Liu IK, Brosnan RJ, Steffey EP. 2010. Uterine vascular elastosis and its effect on uterine blood flow in cyclic mares. *Anim Reprod Sci*. 121S(1–2):S87-88. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.130.

Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie ANJ. 2000. Schistosome Infection of Transgenic Mice Defines Distinct and Contrasting Pathogenic Roles for IL-4 and IL-13: IL-13 Is a Profibrotic Agent. *J Immunol*. 164(5):2585–2591. doi:10.4049/jimmunol.164.5.2585.

Ferreira-Dias G, Claudino F, Carvalho H, Agrícola R, Alpoim-Moreira J, Robalo Silva J. 2005. Seasonal reproduction in the mare: Possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Domest Anim Endocrinol*. 29(1):203–213. doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.006.

Fiala-Rechsteiner SM, Amaral MG, Cruz LA, Rodrigues RF, Pimentel AM, Mattos RC. 2015. Inflammatory Lesions in the Oviducts and Its Relationship With Endometrial Inflammation and Ovarian Activity in Criollo Mares. *J Equine Vet Sci*. 35(9):731–734. doi:10.1016/j.jevs.2015.07.006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.07.006>.

Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. 2006. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nat Med*. 12(1):99–106. doi:10.1038/nm1332.

Foote AK, Ricketts SW, Whitwell KE. 2012. A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology. *Equine Vet J*. 44(SUPPL. 41):120–129. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00507.x.

Fowden AL, Forhead AJ, White KL, Taylor PM. 2000. Equine uteroplacental metabolism at mid- and late gestation. *Exp Physiol*. 85(5):539–545. doi:10.1111/j.1469-445X.2000.02067.x.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. 2019. Physiological development of the equine fetus during late gestation. *Equine Vet J*. 0:1–9. doi:10.1111/evj.13206.

Fowden AL, Ward JW, Wooding FPB, Forhead AJ, Constancia M. 2006. Programming placental nutrient transport capacity. *J Physiol.* 572(1):5–15. doi:10.1113/jphysiol.2005.104141.

Fox H. 1978. Pathology of the placenta. In: Bennington JL, editor. *Major Problems in Pathology* Vol. VII. London: W. B. Saunders.

François A, Chatelus E, Wachsmann D, Sibilia J, Bahram S, Alsaleh G, Gottenberg J-E. 2013. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 15(5):1–9. doi:10.1186/ar4352. <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4352>.

Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. 1991. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology.* 36(5):823–830.

Friedman SL. 2010. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7(8):425–436. doi:10.1038/nrgastro.2010.97. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2010.97>.

Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. 1972. Granulation tissue as a contractile organ. *J Exp Med.* 135(4):719–734. doi:10.1084/jem.135.4.719.

Gruninger B, Schoon HA, Schoon D, Menger S, Klug E. 1998. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *J Comp Pathol.* 119(3):293–309. doi:10.1016/S0021-9975(98)80051-0.

Hafez ESE, Hafez B. 2004. *Reprodução Animal*. 7^a. Manole, editor. São Paulo.

Henderson NC, Iredale JP. 2007. Liver fibrosis: Cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci.* 112(5–6):265–280. doi:10.1042/CS20060242.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. 2007. The myofibroblast: One function, multiple origins. *Am J Pathol.* 170(6):1807–1816. doi:10.2353/ajpath.2007.070112.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. 2012. Recent developments in myofibroblast biology: Paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 180(4):1340–1355. doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.004>.

Hirayama H. 1983. Biochemical studies on collagen in human placenta- relation of collagen to the construction and function of human placenta. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi.* 35(12):2395-2403.

Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B, Schoon HA. 2009. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci.* 111(2–4):261–278. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.03.019.

Iwahashi M, Ooshima A, Nakano R. 1996. Increase in the relative level of type V collagen during development and ageing of the placenta. *J Clin Pathol.* 49(11):916–919. doi:10.1136/jcp.49.11.916.

Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH. 2010. Assessment of Nonischemic Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 56(2):89–97. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.047.

Junqueira LC, Carneiro J. 2013. *Histologia Básica*. 12th ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro.

Kenney RM. 1978. Cyclic and Pathologic Changes of the Mare Endometrium as Detected by Biopsy, with a Note on Early Embryonic Death. *J Am Vet Med Assoc.* 172(3):241–262.

Kenney RM. 1992. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: Hughes, J.P. (Ed.) *Workshop on Equine Endometritis*. Newmarket, UK. *Equine Vet. J.* 25:186.

Kenney RM, Doig PA. 1986. Equine endometrial biopsy. In: DA Morrow and WB Saunders, editors. *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; p. 723–729.

Khozhaï LI, Otellin VA, Pozharisskii KM, Pavlova NG. 2010. Expression of Contractile Proteins α -actin and Myosin of Smooth Muscle Cells and of Type IV Collagen in Human Placenta at Placental Insufficiency in III Trimester of Pregnancy. *J Evol Biochem Physiol.* 46(3):275–281. doi:10.1134/S0022093010030075.

Kramann R, Schneider RK, Dirocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, Henderson JM, Ebert BL, Humphreys BD. 2015. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell.* 16(1):51–66. doi:10.1016/j.stem.2014.11.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004>.

LeBlanc M, Causey R. 2009. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reprod Domest Anim.* 44(SUPPL. 3):10–22. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x.

Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. 2001. Macrophage-neutrophil interaction: A paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol.* 79(5):502–506. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01020.x.

Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. 2009. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. *Hypertension.* 53(6):1041–1047. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123158.

Liu IKM, Esteller-Vico A, Couto S, Hirschbrunner G, Aly S. 2008. Assessment of equine endometrial and myometrial vascular elastosis: relationship to biopsy grade, age and parity. In: LeBlanc MM, editor. *The Chronically Infertile Mare*. New York: The Havemeyer Foundation. p.11–12.

Liu Y, Munker S, Müllenbach R, Weng HL. 2012. IL-13 signaling in liver fibrogenesis. *Front Immunol.* 3(Article 116):1–7. doi:10.3389/fimmu.2012.00116.

Ludwig S, Schoon D, Aupperle H, Von Reischwitz A, Schoon HA. 2001. Angiopathies in the equine endometrial biopsy - A marker for extrauterine vascular lesions? *Pferdeheilkunde.* 17(6):608–614. doi:10.21836/PEM20010614.

Lund FE. 2008. Cytokine-producing B lymphocytes - key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 20(3):332–338. doi:10.1016/j.coi.2008.03.003.

Lunelli D, Cirio SM, Leite SC, Camargo CE, Kozicki LE. 2013. Collagen types in relation to expression of estradiol and progesterone receptors in equine endometrial fibrosis. *Adv Biosci Biotechnol.* 04(04):599–605. doi:10.4236/abb.2013.44078.

Ma Y, Yabluchanskiy A, Lindsey ML. 2013. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 6(1). doi:10.1186/1755-1536-6-11.

Masseno AP. 2009. Caracterização Imunohistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da

expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas. Dissertação (mestrado): Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. 2011. Equine Reproduction. Second Edi. Wiley-Blackwell.

Meneghin A, Hogaboam CM, Meneghin A, Hogaboam CM. 2007. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest.* 117(3):530–538. doi:10.1172/JCI30595.530.

Meyer-ter-Vehn T, Gebhardt S, Sebald W, Buttmann M, Grehn F, Schlunck G, Knaus P. 2006. p38 inhibitors prevent TGF- β -induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 47(4):1500–1509. doi:10.1167/iovs.05-0361.

Morris LHA, Allen WR. 2002. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet J.* 34(1):51–60. doi:10.2746/042516402776181222.

Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 11(11):723–737. doi:10.1038/nri3073. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3073>.

Nanaev AK, Rukosuev VS, Milovanov AP, Fokin EI, Shirinskii VP. 1989. Distribution of collagen types III and IV in villi of the human placenta. 107(2):268–272.

Olman MA. 2009. Beyond TGF- β : A prostaglandin promotes fibrosis. *Nat Am Inc.* 15(12):1360–1361. doi:10.1038/nm1209-1360.

Ousey JC. 2006. Hormone Profiles and Treatments in the Late Pregnant Mare. *Vet Clin - Equine Pract.* 22(3):727–747. doi:10.1016/j.cveq.2006.08.004.

Ousey JC, Forhead AJ, Rosedale PD, Grainger L, Houghton E, Fowden AL. 2003. Ontogeny of Uteroplacental Progestagen Production in Pregnant Mares During the Second Half of Gestation. *Biol Reprod.* 69(2):540–548. doi:10.1095/biolreprod.102.013292.

Ousey JC, Kölling M, Newton R, Wright M, Allen WR. 2012. Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Vet J.* 44(SUPPL. 41):15–21. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00446.x.

Pashen RL. 1984. Maternal and foetal endocrinology during late pregnancy and parturition in the mare. *Equine Vet J.* 16(4):233–238. doi:10.1111/j.2042-3306.1984.tb01918.x.

Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P. 1989. Tumor necrosis factor/ cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med.* 170(September):655–663.

Pinto-Bravo P, Rebordão MR, Amaral A, Fernandes C, Cuello C, Parrilla I, Martínez E, Roberto da Costa RP, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2018. Is mare endometrosis linked to oviduct fibrosis? *Pferdeheilkunde.* 34(1):43–46. doi:10.21836/PEM20180101.

Platt H. 1978. Growth and maturity in the equine fetus. *J R Soc Med.* 71(9):658–661. doi:10.1177/014107687807100906.

Pollack RN, Divon MY. 1992. Intrauterine Growth Retardation: Definition, Classification, and Etiology. *Clin Obstet Gynecol.* 35(1):99–107.

Pozor M. 2016. Equine placenta - A clinician's perspective. Part 1: Normal placenta -

- Physiology and evaluation. *Equine Vet Educ.* 28(6):327–334. doi:10.1111/eve.12499.
- Pycock JF. 2009. Breeding Management of the Problem Mare. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. p. 139–164.
- Raila G. 2000. Zur Pathogenese der Endometrose der Stute. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen. [dissertation] Med. Vet. Univ. Leipzig, Leipzig.
- Rapacz-Leonard A, Kankofer M, Leonard M, Wawrzykowski J, Dąbrowska M, Raš A, Paździor-Czapula K, Janowski T. 2015. Differences in extracellular matrix remodeling in the placenta of mares that retain fetal membranes and mares that deliver fetal membranes physiologically. *Placenta*. 36(10):1167–1177. doi:10.1016/j.placenta.2015.07.126.
- Rebordão MR, Amaral A, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Pinto-Bravo P, Galvão A, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2018. Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology*. 113:8–18. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.02.001.
- Rebordão MR, Galvão A, Amaral A, Szostek A, Lukasik K, Piotrowska-Tomala K, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2013a: Neutrophil extracellular traps and cytokines on the expression of genes involved in mare endometrosis. Conference on “Endometritis as a cause infertility in domestic animals: new diagnostic and therapeutic strategies”. Olsztyn, Poland. p. 18.
- Rebordão MR, Galvão A, Szóstek A, Amaral A, Mateus L, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2014. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reprod Domest Anim.* 49(s4):82–87. doi:10.1111/rda.12397.
- Rebordão MR, Galvão A, Szóstek A, Lukasik K, Piotrowska-Tomala K, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 2013b. Neutrophil extracellular traps and cytokines on prostaglandins and markers of fibrosis (TIMP and TGFB1) in the equine endometrium in vitro. In: 2nd Joint German-Polish Conference on "Reproductive Medicine/46th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction. Gdansk, Poland. p. 54–55.
- Reilas T, Rivera del Alamo MM, Liepina E, Yeste M, Katila T. 2016. Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology*. 85(4):617–624. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.053. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.053>.
- Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, Luther JS, Wallace JM, Wu G, Spencer TE. 2006. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol.* 572(1):51–58. doi:10.1113/jphysiol.2005.104430.
- Ricard-Blum S. 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(1):1–19. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
- Ricketts SW, Alonso S. 1991. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet J.* 23(3):189–192. doi:10.1111/j.2042-3306.1991.tb02752.x.
- Ricketts SW, Rosedale PD, Samuel CA. 1978. Endometrial Biopsy Studies of Mares with Contagious Equine Metritis 1977. *Equine Vet J.* 10(3):160–166. doi:10.1111/j.2042-3306.1978.tb02247.x.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA,

Falanga V, Kehrl JH. 1986. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(12):4167–4171. doi:10.1073/pnas.83.12.4167.

Rukosuev VS, Nanaev AK, Milovanov AP. 1990. Participation of collagen types I, III, IV, V, and fibronectin in the formation of villi fibrosis in human term placenta. *Acta Histochem*. 89(1):11–16. doi:10.1016/S0065-1281(11)80308-9.

Ryan P, Vaala W, Bagnell C. 1998. Evidence that equine relaxin is a good indicator of placental insufficiency in the mare. In *Proceedings 44th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*. (44):62-63.

Samuel CA, Allen WR, Steven DH. 1975. Ultra-structural development of the equine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility*. (23):575–578.

Schlafer DH. 2004. Postmortem Examination of the Equine Placenta, Fetus, and Neonate: Methods and Interpretation of Findings. *Am Assoc Equine Pract*.

Schoon HA, Schoon D. 2003. The Category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - Fact or fiction? *Pferdeheilkunde*. 19(6):698–701. doi:10.21836/pem20030626.

Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. 2001. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 21(3):351–372. doi:10.1055/s-2001-17556.

Sebastian M, Benirschke K. 2007. Comparative placentation: Domestic horse – *Equus caballus*. [updated 2007 March 21; accessed 2020 September 15]. <http://placentation.ucsd.edu/indxf.html>.

Serini G, Gabbiani G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res*. 250(2):273–283. doi:10.1006/excr.1999.4543.

Serrano-Recalde EC, Queiroz-Silva JC, Guimarães C de F, Veras MM, Barbosa RG, Alonso MA, Fernandes CB. 2017. Pluriparidade Nas Éguas: Relação Com Características Maternas, Placentárias E Neonatais. *Ciência Anim Bras*. 18(0):1–11. doi:10.1590/1089-6891v18e-33567.

Sibley C, Glazier J, D'Souza S. 1997. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp Physiol*. 82(2):389–402. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004034.

Sinno H, Prakash S. 2013. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast Surg Int*. 2013:1–7. doi:10.1155/2013/146764.

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesse D, Gabbiani G. 1986. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*. 103(6):2787–2796. doi:10.1083/jcb.103.6.2787.

Skarzynski DJ, Szóstek-Mioduchowska AZ, Rebordão MR, Jalali BM, Piotrowska-Tomala KK, Leciejewska N, Łazarczyk M, Ferreira-Dias GM. 2020. Neutrophils, monocytes and other immune components in the equine endometrium: Friends or foes? *Theriogenology*. 150(xxxx):150–157. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.01.018.

Steven DH, Samuel CA. 1975. Anatomy of the placental barrier in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. (23):579–582.

Szóstek-Mioduchowska AZ, Lukasik K, Skarzynski DJ, Okuda K. 2019. Effect of transforming

growth factor - β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology*. 124:9–17. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.10.005.

Torricelli AAM, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. 2016. The corneal fibrosis response to epithelial-Stromal injury. *Exp Eye Res*. 142:110–118. doi:10.1016/j.exer.2014.09.012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.012>.

Tsutsumi Y, Suzuki H, Takeda T, Terami Y. 1979. Evidence of the origin of the gelatinous masses in the oviducts of mares. *J Reprod Fertil*. 57:287–290.

Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. 2014. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res*. 102(2):258–269. doi:10.1093/cvr/cvu062.

Vogel C, Marcotte EM. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 13(4):227–232. doi:10.1038/nrg3185. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3185>.

Volkman DH. 2005. The routine examination of the equine fetal membranes.

Weber KT. 2000. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 15(4):264–272. doi:10.1097/00001573-200007000-00010.

Wilsher S, Allen WR. 2002. The effects of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. *Theriogenology*. 58:833–835.

Wilsher S, Allen WR. 2003. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Vet J*. 35(5):476–483.

Wilsher S, De Rijck M, Rigali F, Allen WR. 2019. The effects of endometrial damage on placental and fetal development in a mare. *Equine Vet Educ*.:1–11. doi:10.1111/eve.13157.

Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Squires EL, Troedsson MHT. 2012. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*. 78(3):495–501. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.028>.

Wynn TA. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 117(3):524–529. doi:10.1172/JCI31487.524. <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/117/3/524>.

Wynn TA. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 214:199–210. doi:10.1002/path.

Yang J, Chi C, Liu Z, Yang G, Shen ZJ, Yang XJ. 2015. Ultrastructure damage of oviduct telocytes in rat model of acute salpingitis. *J Cell Mol Med*. 19(7):1720–1728. doi:10.1111/jcmm.12548.

Zhao S, Fernald RD. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol*. 12(8):1047–1064. doi:10.1089/cmb.2005.12.1047.

Anexo 1

COLLECTION OF EQUINE PLACENTAL SAMPLES

INSTRUCTIONS:

PREPARATION OF THE COLLECTING MATERIAL

1. For each mare, prepare:

- 1 red-top blood collection tube (dry tube), 10ml (for serum);
- 1 purple-top blood collection tube (EDTA), 10ml (for plasma);
- 5 cryotubes (labelled A to E), with 1ml of RNA Later® (for RNA extraction);
- 5 Falcon tubes (labelled A to E), with (5ml of buffered 4% formaldehyde solution (for histopathology).

COLLECTING MATERNAL BLOOD SAMPLES

1. Collect maternal blood into both a red-top and a purple-top (EDTA) blood collection tube.
2. Keep the tubes at 4°C until centrifugation (for 15min., 4°C, 1,000g). Pipette out the serum (red top- dry tube) or plasma (purple top- EDTA tubes) and keep them in Eppendorf tubes, marked with the mare's name, date and if it is serum (S) or plasma (P). Keep at -20°C until analysis.

COLLECTING PLACENTAL SAMPLES

1. If possible, take digital photos of the placenta;
2. Record the placental weight and measurements in the form below;
3. Turn the placenta inside out, in order to have the allantoic surface inside and the chorionic surface facing outside;
4. Collect the samples (approximately size of 2x2cm and 1cm thick, each) from different parts of the placenta, as indicated in figure 1. From each location (A to E), please collect 2 samples: place one of them in an RNA Later tube, and the other one in a formalin tube.

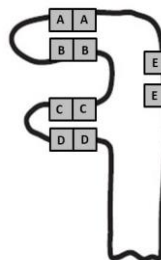


Figure 1 – Location of collection sites: A – gravid horn (upper part); B – gravid horn (lower part); C – non-gravid horn (upper part); D – non-gravid horn (lower part); E – body.

5. Keep the RNA Later tubes at 4°C for about 24h, and then transfer them to -80°C or -20°C. Keep the formalin tubes at room temperature.

SAMPLE COLLECTION FORM:

Collection date:

Mare:

Name: _____

Breed: _____

Age: _____

Reproductive history: _____

Gestation length (days): _____

Foaling date: _____

Foaling history: _____

Placenta:

Placenta passed (hours post-partum): _____

Placental weight: _____

Placental area: _____

Umbilical cord length: _____

Abnormal findings (indicate in figure 2): _____

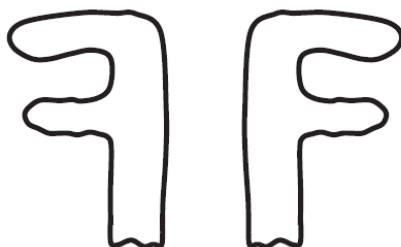


Figure 2 – Chorioallantois – please indicate any abnormal areas, missing fragments or sites of additional samples.

Figura 18. Formulário de recolha de amostras de placenta equina.